BIOCHEMISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER IN VITRO UND IN VIVO INDUZIERTEN INTERFERONE DER MAUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Brehm
aus Stuttgart
1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0014

BIOCHEMISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER IN VITRO UND IN VIVO INDUZIERTEN INTERFERONE DER MAUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Brehm
aus Stuttgart

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	16.06.1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Mecke
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Probst
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. Anderer

Herrn Prof. Dr. H. Kirchner möchte ich für die Stellung des Themas sowie die Gewährung des Arbeitsplatzes danken. Herrn Prof. Dr. H. Probst danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit zu übernehmen. Für die experimentelle Betreuung der Arbeit, die vielen Ideen und strategischen Hinweise danke ich neben Prof. Dr. H. Kirchner vor allem Dr. R. Zawatzky. Dr. E. Storch half mir durch anregende Diskussionen, die in gemeinsamen Publikationen mündeten. S. Mittnacht danke ich für wertvolle Informationen bei der Bewältigung technischer Probleme und der Entwickung und Diskussion von Ideen. Prof. Dr. H. Ankel trug während zweier Gastaufenthalte nicht nur zur Vergrößerung meines Wissens über Interferonwirkung bei, sondern ermöglichte durch hilfreiche Hinweise die Etablierung mehrere Testsysteme.

Während meines USA-Aufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Laughlin konnte ich die Handhabung einiger molekularbiologischer Techniken erlernen.

Akademische Lehrer:

in Tübingen

Professor Dr. A.A. Anderer
Professor Dr. E. Bayer
Professor Dr. V. Braun
Professor Dr. H. Hagenmaier
Professor Dr. D. Mecke
Professor Dr. Dr. h.c. H. Metzner
Professor Dr. H. Ninnemann
Professor Dr. H. Probst
Professor Dr. K. Reutter
Professor Dr. Dr. G. Weitzel
Professor Dr. U. Weber
Professor Dr. W. Voelter
Professor Dr. H. Zähner

außerhalb Tübingen

Professor Dr. H. Ankel
Professor Dr. W. Bessler
Professor Dr. H. Kirchner
Professor Dr. C. Laughlin

"Überall herrscht der Zufall.

Laß Deine Angel nur hängen, wo Du's am wenigsten glaubst, sitzt im Strudel der Fisch."

Ovid

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	**Einleitung**	1
1.2	Zielsetzung	9
2.	**Material und Methoden**	11
2.1.	Material	11
2.1.1.	Zellkultur	11
2.1.2.	Interferoninduktoren	11
2.1.3.	Zellinien	11
2.1.4.	Viren	11
2.1.5.	Antiseren gegen Interferon	11
2.1.6.	Interferon	12
2.1.7.	Säulenchromatographie	12
2.1.8.	gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	12
2.1.9.	Interferonklone der Maus	12
2.1.10.	Bakterien	12
2.1.11.	Vektoren	12
2.1.12.	Kontrollklone	12
2.1.13.	Molekularbiologische Methoden	12
2.1.14.	in situ Hybridisierung	13
2.1.15.	Radioaktiv markierte Nukleotide	13
2.2.	Tiere	13
2.3.	Interferoninduktion von Knochenmarksmakrophagen	13
2.3.1.	Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen	13
2.3.2.	Umspezifische Esterase	14
2.3.3.	Interferoninduktion	15
2.4.	Interferon-Test	15
2.4.1.	Anlegen der L-Zellen	15
2.4.2.	Applikation der Zellüberstände in den Interferontest	16
2.4.3.	Infektion der Zellkulturen	16
2.4.4.	Auswertung des Interferontests	16

		Seite
2.5.	Virusaufarbeitung und Konzentrationsbestimmung	16
2.5.1.	Enzephalomyokarditis Virus Stock (EMCV)	16
2.5.2.	Hämagglutinationstest	17
2.5.3.	Plaqueassay	18
2.6.	Charakterisierung der Interferone	18
2.7.	Somatische Fusion zur Herstellung von Mensch-Haushybriden	19
2.7.1.	Kultivierung menschlicher Fibroblasten (BUD-8)	19
2.7.2.	Erzeugung von Mensch-Maushybriden	20
2.7.2.1.	Vorbereitung der Monolayerzellen	20
a)	Makrophagen der Maus	70
b)	Fibroblasten des Menschen (BUD-8)	20
2.7.2.2.	Anlegen der Zellen für die Fusion	20
a)	Kontrollansätze	20
b)	Fusionsansatz	20
2.7.3.	Fusionsbedingungen	20
2.7.4.	Fixieren der Zellen mit Ethanol-Eisessig	21
2.7.4.1.	Färben der Zellen	21
2.7.5.	Induktion der Zellen	21
2.7.6.	Interferontest auf menschlichen Fibroblasten (CPE-Methode)	22
2.8.	Säulenchromatographie	22
2.9.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	22
2.10.	Extraktion der Interferone aus Polyacrylamidgelen	25
2.11.	Isolierung von Plasmid DNA	26
2.11.1.	Minipräparation	26
2.11.2.	Maxipräparation	26
2.12.	RNA-Präparation	27
2.12.1.	Isolierung gesamtzellulärer RNA	27
2.12.2.	Isolierung von PolyA^+-RNA	28
2.12.3.	RNA-Präparation aus geringer Zellzahl	29
2.13.	Gelelektrophorese	30
2.13.1.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	30
2.13.1.1.	Native Agarosegele	30
2.13.1.2.	Polyacrylamidgele	30
2.13.2.	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	31

Seite

2.14. Insertpräparation 32
2.14.1. Restriktionsverdau 32
2.14.2. Polyacrylamidgele 33
2.14.3. Elektroelution der DNA 33
2.14.4. Quantifizierung der DNA 33

2.15. Radioaktive Markierung der DNA 34
2.15.1. Nicktranslation 34
2.15.2. "Oligolabeling" 35

2.16. "Blotting" und Hybridisierung 36
2.16.1. Northernblots 36
2.16.2. Dot-Blot-Hybridisierung 37

2.17. "Run on transcription" 38
2.17.1. Aufbringen der DNA auf Nylonmembran 38
2.17.2. Kernpräparation 38
2.17.3. Transkription der RNA 40
2.17.4.1. Kernlyse und Proteinase K-Verdau 40
2.17.4.2. DNase-Verdau der RNA 40
2.17.4.3. Elution der RNA 40
2.17.5. Hybridisierung 41

2.18. In situ Hybridisierung 41
2.18.1. Vorbehandlung der Objektträger 41
2.18.1.1. Silikonisieren der Deckgläschen 41
2.18.2. Zentrifugieren und Fixieren der Zellen auf Objektträger 42
2.18.2.1. Zentrifugation 42
2.18.2.2. Fixieren der Zellen 42
2.18.3. Vorbereitung der Zellpräparate für Hybridisierung 42
2.18.4. RNase-Kontrollen 42
2.18.5. Hybridisierung 43
2.18.6. Autoradiographie 44
2.18.7. Färben der Präparate 44
2.18.8. Auswerten der Präparate 44

2.19. Umklonieren von DNA 44
2.19.1. Restriktionsverdau 45
2.19.2. Dephosphorylieren der Plasmidvektoren 45
2.19.3. Ligation 46
2.19.4. Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA 46
2.19.5. Verifizierung umklonierter DNA 47

		Seite
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen	48
3.2.	Erzeugung von Mensch-Maus-Hybriden durch Fusion von Knochenmarksmakrophagen mit BUD-8 Zellen und Interferoninduktion mit CMA	51
3.3.	Charakterisierung in vitro und in vivo induzierter Interferone	56
3.3.1.	In vitro induzierte Interferone	57
3.3.1.1.	Molekulargewichtsbereich und Antigenität der in vitro induzierten Interferone	57
3.3.1.1.1.	CMA-induzierte Interferone	57
3.3.1.1.2.	PIC-induzierte Interferone	58
3.3.1.1.3.	NDV-induzierte Interferone	58
3.3.2.	In vivo induzierte Interferone	59
3.3.2.1.	Molekulargewichtsbereich und Antigenität in vivo induzierter Interferone	59
3.3.2.1.1.	CMA-induzierte Interferone	59
3.3.2.1.2.	PIC-induzierte Interferone	59
3.3.2.1.3.	NDV-induzierte Interferone	60
3.3.3.	Glykosylierung induzierter Interferone	62
3.4.	Auftrennung von Interferonpräparationen über CH-Sepharose 4B und deren Charakterisierung	63
3.4.1.	pH-Wert und Leitfähigkeit als Elutionsparameter der CH-Sepharose 4B-Säule	63
3.4.2.	Interferonaktivität in vitro und in vivo nach CMA-Induktion	64
3.4.2.1.	In vitro Induktion von Interferon mit CMA	64
3.4.2.2.	Neutralisation der Aktivitäten mit Antikörper gegen Interferon-β	65
3.4.2.3.	In vivo Induktion von Interferon durch CMA	65
3.4.3.	In vitro und in vivo Induktion von Interferon durch PIC	66
3.4.3.1.	In vitro Induktion von Interferon durch PIC	66
3.4.3.2.	Induktion von Interferon in vivo mit PIC	67
3.4.4.	Induktion von Interferon in vitro und in vivo durch NDV	67
3.4.4.1.	Induktion von Interferon in vitro mit NDV	68
3.4.4.2.	Induktion von Interferon in vivo mit NDV	69
3.4.4.2.1.	Auftrennung des Serum-Interferons nach dreistündiger NDV-Induktion	69
3.4.4.2.2.	Auftrennung des Serum-Interferons nach achtstündiger NDV-Induktion	69

Seite

3.5. Charakterisierung und Quantifizierung der mRNA induzierter Makrophagen 71

3.5.1. Hybridisierung von mRNA nach Induktion mit NDV 72

3.5.1.1. NDV-induzierte mRNA aus C243-Zellen und aus Makrophagen 72

3.5.1.2. NDV-induzierte PolyA$^+$-mRNA in Makrophagen 73

3.5.2. Induktion von Interferon mit CMA, PIC und NDV in Mausmakrophagen 74

3.5.3. Induktionskinetik von mRNA aus Makrophagen induziert mit CMA und NDV 75

3.5.4. Detektion eines Interferon-α mRNA-Signals nach NDV-Induktion von Makrophagen 77

3.5.5. Kinetik der RNA-Expression und Interferontiter nach NDV- und CMA-Induktion von Markophagen 78

3.5.6. Hybridisierungssignal mit mRNA aus nichtinduzierten Zellen 80

3.6. "Run-on-transkription" 81

3.7. In situ Hybridisierung 83

3.7.1. Induktion von Makrophagen mit NDV 83

3.7.2. Induktion von Makrophagen mit CMA 87

3.7.3. Induktion von Makrophagen und Hybridisierung mit einer ^{32}P-markierten cDNA 91

3.7.4. RNase Behandlung nicht induzierter Zellen und Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNAs 92

3.7.5. Vergleich von Spezifität des Hybridisierungssignals mit anderen Parametern 94

3.7.5.1. Gesamtplasmid oder Insert cDNA als spezifische Probe 94

3.7.5.2. Expositionszeit 95

3.7.5.3. cDNA-Menge pro Ansatz und deren spezifische Aktivität 95

3.7.5.4. Homogenität des Hybridisierungssignals nach Induktion der Zellen 96

3.8. Übersicht über die Ergebnisse 96

4. Diskussion 98

5. Zusammenfassung 114

6. Literaturverzeichnis 116

7. Abkürzungen 135

8. Curriculum vitae 136

1. EINLEITUNG

Auf der Suche nach dem Mechanismus der "viralen Interferenz" konnten vor dreißig Jahren Isaacs und Lindemann (1957) ein Mediatorprotein als deren Ursache nachweisen. Im experimentellen Ansatz infizierten sie in Kultur gehaltene Membranbestandteile von Hühnerallantois (Fulton und Armitage, 1951) mit inaktiviertem Influenzavirus. Die dabei erzeugte Substanz verhinderte in Zellen einer zweiten Kultur die Replikation von verwandten wie auch nicht verwandten Viren. Diese überzeugenden Experimente bewiesen die Existenz einer antiviralen Substanz, die als "Interferon" bezeichnet wurde.

Die Interferone (IFN) unterteilen sich in drei Typen: IFN-α, IFN-β und IFN-γ. IFN-α und -β werden auch als Typ I Interferon und IFN-γ als Typ II Interferon bezeichnet. In allen Vertebraten findet man IFN, unter denen die Interferone des Menschen und der Maus am besten charakterisiert sind. Die α Interferone des Menschen stellen eine Multigenfamilie dar. Ihre Gene wurden dem kurzen Arm des Chromosom 9 zugeordnet (Trent et al., 1982). Dort konnten bis jetzt 10 nahverwandte IFN-α Gene identifiziert werden. Diese werden zumindest auf mRNA-Ebene exprimiert (Nagata et al., 1980; Goeddel et al., 1980; Hiscott et al., 1984) und einige auch auf Proteinebene (Allen und Fantes, 1980). Sie werden als Klasse I- oder Subfamilie IFN α_I-Gene bezeichnet (Capon et al., 1985). 1985 wurde ein funktionelles Gen, ferner verwandt mit den IFN α_1-Genen, charakterisiert und als IFN $\alpha_{II}1$ bezeichnet. Daneben existieren noch zumindest 5 Pseudogene (Goeddel et al., 1981; Henco et al., 1984).

Im Gegensatz zu der Vielzahl der IFN-α Gene sind bei den IFN-β Genen des Menschen bislang nur zwei Vertreter bekannt: IFN-β1 und IFN-β2. Wie die IFN-α Gene liegt auch das IFN-β1 Gen auf dem Chromosom 9, IFN-β2 hingegen auf Chromosom 7. IFN-α und IFN-β1-Gene existieren in einem Gencluster von einigen hundert Kilobasen. Die Nukleotidhomologie innerhalb der IFN-α Gene liegt bei 85-95% in der kodierenden Region und zwischen den IFN-α und IFN-β Genen bei ungefähr 50% (Taniguchi et al., 1980; Ohno und Taniguchi, 1981). Das IFN-β2 Gen besitzt kaum Homologie zu IFN-α und zu IFN-β1 auf Nukleotidebene. Die Verwandtschaft von IFN-β1 und IFN-β2 beruht auf der Kreuzreaktivität von Antikörpern und in einigen anderen biologischen Aktivitäten (Zilberstein et al., 1986). Sowohl in der Lokalisation auf Chromosom 7 als auch in der Existenz von 3 Introns unterscheidet sich IFN-β2 genotypisch von den Typ I Interferonen (Sehgal et al., 1986; Trent et al., 1982; Naylor et al., 1983). Das IFN-γ Gen besitzt

keine Sequenzhomologie zu den IFN-α und IFN-β Genen und besteht aus 4 Exons und 3 Introns und liegt auf Chromosom 12 (Gray und Goeddel, 1982).

Die Expression innerhalb der IFN-α Genfamilie ist sehr unterschiedlich. So bilden IFN-α1, α2 und α4 mRNA den größten Anteil an Transkripten in Sendai Virus induzierten Leukozyten, während andere mRNAs wie IFN-α5, α6 oder α8 nur in geringen Mengen auftreten (Hiscott et al., 1984). Bei der Expression des IFN-β1 Gens spielt die 5' flankierende Region eine wichtige Rolle bei der maximalen Induktion (Ohno und Taniguchi, 1983). Dort befinden sich induzierbare Verstärkerelemente, die unter negativer Kontrolle liegen sollen (Fujita et al., 1985; Enoch et al., 1986; Goodburn et al., 1985; 1986; Tavernier et al., 1983).

Im Gegensatz zu IFN-β_1 wurde die Induktion der IFN-β2 Sekretion in Fibroblasten nach Stimulation mit Zytokinen, wie Interleukin I oder Tumor Nekrosis Faktor beobachtet (Zilberstein et al., 1986). Die Induktion von IFN-γ erfolgt nach Mitogen- oder Antigenstimulation ausschließlich in T-Lymphozyten.

Humane IFN-α Gene kodieren für Proteine mit 189 Aminosäuren (Goeddel et al., 1986). Die Signalpeptide am N-Terminus besitzen Transportfunktion und werden beim Durchdringen der Membran des endoplasmatischen Retikulums abgespalten. Alle Interferone haben Signalpeptide zwischen 19 und 24 Aminosäuren. Die vollständige Aminosäuresequenz (166 Aminosäuren) für IFN-β1 wurde aus der Sequenzierung klonierter cDNA abgeleitet (Taniguchi et al., 1980; Goeddel et al., 1980; Derynck et al., 1980). Die Homologie zu IFN-α liegt bei etwa 29%. Im Gegensatz dazu besteht IFN-β2 aus 212 Aminosäuren (Zilberstein et al., 1986). Computeranalysen ergaben, daß die IFN-β1 und β2 Sequenzhomologie mit 20% auf Proteinebene sehr niedrig ist (Revel et al., 1986). Humanes IFN-γ besteht aus 146 Aminosäuren (Gray et al., 1982; Gray und Goeddel, 1982) und zeigt nur geringe Sequenzverwandtschaft mit IFN-α (Alton et al., 1983).

Im IFN-System der Maus liegen die Gene von IFN-α und IFN-β auf Chromosom 4 (Lovett et al., 1984; van der Korput et al., 1985). Die IFN-α Familie der Maus umfaßt wahrscheinlich mehr als 10 Mitglieder, von denen bisher 6 definiert wurden (Kelley et al., 1983; Shaw et al., 1983). Sie haben etwa 90% Homologie untereinander und 50-60% zu menschlichem IFN-α (Zwarthoff et al., 1985; Dion et al., 1986). Obwohl man davon ausgeht, daß die IFN-α Gene der Maus durch Tandem-Duplikationen entstanden, gibt es doch innerhalb der Genfamilie Unterschiede. So besitzen z.B. die Promotorsequenzen von IFN-α1, α5 und α6

untereinander eine größere Homologie als zum IFN-α4 Promotor (Kelley und Pitha, 1985). In der Maus existiert, so weit bekannt, nur ein einziges Gen für IFN-β, das auch auf Chromosom 4 liegt (Kelley et al., 1985) und ein offenes Leseraster von 680 Basenpaaren hat (Highashi, 1985). Das IFN-γ Gen liegt auf Chromosom 10, also wie im menschlichen System nicht vergesellschaftet mit den anderen IFN Genen (Naylor et al., 1984). Wie menschliches IFN-γ besteht auch das IFN-γ Gen der Maus aus 4 Exons und 3 Introns und zeigt zu diesem eine Nukleotidhomologie von 60-65% (Gray und Goeddel, 1983).

Die IFN-α Gene der Maus exprimieren Proteine von 166 (α1, α5, α6) oder 167 Aminosäuren (α2, α4) (Zwarthoff et al., 1985; Shaw et al., 1983). Zwischen den IFN-α Proteinen besteht eine Homologie von 85-90% (Shaw et al., 1983) und nur von 27% zu IFN-β (Zwarthoff et al., 1985; Daugherty et al., 1984). IFN-β hat ein offenes Leseraster, das für 161 Aminosäuren kodiert. Das IFN-β der Maus ist 63% auf Nukleotidebene und 48% auf Aminosäureebene mit menschlichem IFN-β1 homolog (Higashi et al., 1983; Fiers et al., 1983). Mit 136 Aminosäuren ist das exprimierte IFN-γ der Maus 10 Aminosäuren kürzer als das menschliche (Gray und Goeddel, 1983) und zeigt zu diesem eine Sequenzhomologie auf Proteinebene von 40%.

Die IFN-Induktion in Zellen hängt von einer funktionierenden RNA- und Proteinbiosynthese ab. Das dauert bei der Induktion mit Viren nur wenige Stunden. Die IFN Gene werden nur eine begrenzte Zeit exprimiert. Nach der Induktion läuft die IFN Produktion auch in Abwesenheit des Induktors ab. Die IFN Induktion wird als Derepression der IFN Gene angesehen. So konnte die Aktivierung des menschlichen IFN-β Gens in defizienten humanen Zellen durch einen transaktivierenden Faktor von Mauszellen gezeigt werden, der als induzierbares Element die Genexpression reguliert (Enoch et al., 1986; Goodburn et al., 1985).

Als Induktoren können eine Vielzahl von Substanzen verwendet werden, die sich hinsichtlich der Zielzelle und des induzierten IFN Typs unterscheiden. Klassische Induktoren von IFN sind Viren. Sowohl Einzelstrang-RNA, Doppelstrang-RNA oder DNA-Viren können als Induktoren dienen. Zu den starken Induktoren gehört das Newcastle Disease Virus (NDV) aus der Familie der Paramyxoviren (Einzelstrang-RNA Virus). NDV induziert in vivo und in vitro hohe Konzentrationen an IFN (Ho et al., 1970). Zu den viralen Induktoren mit einem DNA-Doppelstrang gehören Papova- oder Adenoviren und Herpes Simplex Virus (HSV).

Weiterhin zählen natürliche und synthetische Doppelstrang-RNAs zu den wirksamen IFN-Induktoren (Field et al., 1967). Um optimal zu induzieren, sollten

sie unter anderem ein Molekulargewicht von mehr als 100 000 d haben und gegen Nukleasen resistent sein (Phosphatgruppe ersetzt durch Thiophosphatgruppe). Als bester Induktor erwies sich Polyinosyl-Polycytidylsäure (PIC), entweder allein oder im Zusammenwirken mit DEAE-Dextran (Field et al., 1967). Die Induktion von IFN mit Poly(I)-poly(C) erfolgt schon nach kurzer Zeit. Es wurde geschätzt, daß 10-20 min nach Induktion von FS-4 Zellen (menschliche Fibroblasten) die Transkription der IFN mRNA beginnt (Sehgal und Tamm, 1980).

Außerdem können Interferone durch eine Vielzahl von Substanzen verschiedenster molekularer Strukturen induziert werden. Zu den hochmolekularen Induktoren gehören Corynebacterium parvum (Kirchner et al., 1977), Präparation von Staphylococcus Enterotoxin A (Johnson et al., 1977) oder Phytohämagglutinin (Edelman und Wheelock, 1966). Die niedermolekularen Induktoren sind zumeist synthetisch und von sehr unterschiedlicher Struktur. Dazu gehören substituierte Pyrimidine, Tiloron oder Acridinderivate wie 10-Carboxymethyl-9-acridanon (CMA) (Kramer et al., 1976). CMA induziert hohe Titer in Mäusen und Hamstern (Taylor et al., 1980). In vitro erzeugt CMA hohe IFN Titer in Mausmakrophagen (Storch et al., 1982).

Die nach der Induktion im Überstand von Zellkulturen und im Serum vorhandenen Interferone lassen sich physikochemisch unterscheiden. IFN-α und IFN-β sind bei pH 2 stabil und zeigen eine gewisse Resistenz gegenüber Detergentien. Die Ausnahme bildet ein säurelabiles humanes IFN-α, das in Leukozyten induziert wird (Balkwill et al., 1983). Dieses IFN findet sich auch im Serum von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes oder mit "Acquired Immunodeficiency Syndrome" (AIDS) (Preble et al., 1983; Eyster et al., 1983). Auch IFN-γ ist säurelabil und instabil in Gegenwart von Detergentien.

Interferone werden nicht spontan, sondern erst nach Induktion exprimiert. Ohne die "anstoßende" Wirkung des Induktors kommt es zu keiner IFN-Produktion. IFN-Proteine können quantitativ und qualitativ in biologischen Testsystemen bestimmt werden. Die Bestimmung der Art und Menge an IFN mRNA kann über Hybridisierungsexperimente mit einer spezifischen radioaktiv markierten IFN-DNA erfolgen. So erlaubt die in situ Hybridisierung die IFN-Induktion auf Einzelzellebene zu untersuchen (Zawatzky et al., 1985). Die Bestimmung der biologischen IFN-Aktivität erfolgt in Zellkulturen. Man nützt hier den antiviralen Effekt der Interferone aus, indem die je nach IFN-Konzentration reduzierte Virusmenge über die Plaque-Reduktionsmethode (verminderte Anzahl von Virusplaques) oder die CPE-Inhibitionsmethode (zytopathischer Effekt) ermittelt wird (Stewart,

1974). Die so bestimmte IFN-Aktivität kann dann anhand entsprechender Referenzstandards in internationalen Einheiten ausgedrückt werden.

Die Interferone, induziert in verschiedensten Zellsystemen, wurden isoliert, gereinigt und charakterisiert. Homogene Präparationen von menschlichem IFN-α oder IFN-ß haben eine spezifische Aktivität von etwa 10^9 Einheiten pro mg Protein. Die in menschlichen peripheren Blutlymphozyten oder Monozyten induzierten Interferone sind sehr heterogen. Bis zu 13 IFN-α Spezies konnten nach Trennung über Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) unterschieden werden (Heron et al., 1983). Lymphozyten und Monozyten erzeugten IFN-α mit Molekulargewichten von 20-26 000 d (Goren et al., 1986). IFN wird auch in lymphoblastoiden Zellinien (Namalva) induziert. Namalvazellen produzieren eine Mischung von IFN-α und IFN-ß im Verhältnis 9:1. Beide wurden als Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 16 000 und 26 000 d identifiziert (Knight, 1976; Havell et al., 1977). Die Hauptkomponente des menschlichen lymphoblastoiden IFN hat ein Molekulargewicht von 18 500 d (Zoon et al., 1980) und scheint nicht oder nur schwach glykosyliert zu sein (Allen und Fantes, 1980).

Menschliches IFN-ß1 wird in Fibroblasten zusammen mit etwa 20% IFN-α induziert (Havell et al., 1978). IFN-ß aus diploiden Fibroblastenkulturen hatte ein Molekulargewicht von 20 000 d und war glykosyliert, wie durch Induktionsversuche (Knight und Fahey, 1982) mit Sendaivirus in Fibroblasten in Gegenwart von Glykosidasen oder Tunicamycin gezeigt werden konnte. Die biologische Aktivität blieb auch ohne den Zuckeranteil voll erhalten. Lediglich eine erniedrigte Hitzestabilität und verringerte IFN-Ausbeute nach Induktion wurden beobachtet (Watanabe und Kawade, 1983; Knight und Fahey, 1982).

Nur bei einer intakten Tertiärstruktur der Interferone bleibt die biologische Aktivität voll erhalten. Positionen oder Anzahl der Cysteine in der Aminosäuresequenz spielen eine entscheidende Rolle beim Zustandekommen von Disulfidbrücken, die zum dreidimensionalen Gefüge der Proteine beitragen. So scheint, daß IFN-α über die 4 Cysteinreste im Protein zwei Schwefelbrücken bildet. Bei 3 Cysteinen im Aminosäuregerüst hat IFN-ß nur eine einzige Disulfidbrücke (Wetzel, 1981). Wie schon beschrieben, gibt es im Humansystem ein zweites IFN-ß Gen. Es kodiert für ein Glykoprotein von 23 700 d, das durch TNF oder Interleukin I induziert wird (Zilberstein, 1985, 1986). Humanes IFN-γ wird ausschließlich in T-Zellen nach Mitogen- oder Antigenstimulation gebildet. Wahrscheinlich sind Ia-positive T-Lymphozyten die Produzentenzellen (Schober et al., 1984). IFN-γ hat eine spezifische Aktivität von 10^8-10^9 U pro mg Protein.

Rezeptorbindungsstudien ergaben, daß die IFN des Typ I (IFN-α und β) an einen gemeinsamen Rezeptor auf ihren Zielzellen binden. Typ II IFN (IFN-γ) besitzt seinen eigenen Rezeptor (Orchansky et al., 1984; Branca und Baglioni, 1981).

In der Maus wurden die in vivo (im Serum) und in vitro (in Zellkulturen) induzierten Interferone charakterisiert. Unabhängig vom Induktor waren alle Typen glykosyliert. Typ I IFN (IFN-α und β), nicht aber Typ II IFN (IFN-γ) waren bei pH 2 und in niedrigen Konzentrationen an Detergentien stabil. Die spezifische Aktivität von Typ I IFN der Maus liegt zwischen 2 und 3 x 10^9 U und von Typ II bei etwa 5 x 10^8 U pro mg Protein.

Am besten charakterisiert sind die in vitro induzierte Interferone in Fibroblasten (L-929-Zellen, C243-Zellen), Ehrlich Aszites Tumor Zellen (EAT-Zellen) und in Makrophagen. Die Induktion von L-929 Zellen führte zu zwei unterschiedlichen Komponenten von IFN, die sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität und Hitzestabilität unterschieden (Yamamoto et al., 1977). Die kleinere Komponente hatte ein Molekulargewicht von 24 000 d und die größere von 36-40 000 d (Iwakura et al., 1978; Kawade et al., 1978). Die zwei Komponenten zeigten unterschiedliche Antigenität. Die Kleinere entsprach IFN-α und die Größere IFN-β (Yamamoto und Kawade, 1980). Nach gezielter Aufreinigung von IFN-β über Antikörpersäulen wurde ein Molekulargewicht von 33 000 d ermittelt (Vonk und Trapman, 1983). Die IFN vom Typ I der Maus sind Glykoproteine. Das nicht glykosylierte Protein hatte ein Molekulargewicht von 18 000 d (Fujisawa et al., 1978). Ohne ihren Zuckeranteil scheinen auch die Interferone der Maus eine größere Hitzesensibilität zu besitzen. Bei IFN-β ist die Glykosylierung für Stabilität und Sekretion wichtig.

In C243-Zellen wurden nach Virusinduktion die gleiche IFN-Verteilung wie bei L-929-Zellen beschrieben. Eine 22-24 000 d und eine 35 000 d Komponente wurde nachgewiesen, die IFN-α und IFN-β entsprachen (DeMaeyer-Guignard et al., 1978). Diese Heterogenität konnte durch Tunicamycinbehandlung während der Induktion auf ein Molekulargewicht von 15-18 000 d reduziert werden (Raj und Pitha, 1981).

Bei der Induktion von EAT-Zellen traten IFN-Aktivitäten dreier unterschiedlicher Molekulargewichte auf. Durch vergleichende Studien konnten die zwei hochmolekularen Spezies (A mit 35-40 000 d und B mit 26-33 000 d) dem IFN-β Typ und die kleinere Spezies (C mit 20 000 d) dem IFN-α Typ zugeordnet werden (Taira et al., 1980; Kawakita et al., 1978; Kawade et al., 1982; Carber et al., 1979). Die unterschiedlichen Molekulargewichte für IFN-β beruhten wahrscheinlich

auf Unterschieden im Glykosylierungsgrad, bedingt durch 3 N-Glykosylierungsstellen im Protein (Higashi et al., 1983).

IFN Induktion in Makrophagen ergibt hauptsächlich IFN-ß (Maehara und Ho, 1977; Brehm et al., 1986). In vivo Studien dagegen zeigten, daß im Tier meist mehr IFN-α als IFN-ß nachweisbar war (Machida et al., 1984; Brehm und Kirchner, 1986).

IFN-γ der Maus wird analog dem humanen System nur von T-Zellen auf Antigen- oder Mitogenstimulation gebildet; sowohl durch Mitogen oder TCGF (T cell growth factor) stimulierte T-Lymphozyten der Milz als auch in Linien von T-Zell Lymphomen. Es machte keinen Unterschied, ob T-Zellen unter Zugabe des T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) kultiviert wurden oder von einem T-Zell-Lymphom abstammten (Marcucci et al., 1982; Gribaudo et al., 1984). Die Größe des natürlichen IFN-γ liegt zwischen 38 und 80 000 d (Osborne et al., 1979). Die von der kodierten DNA-Sequenz abgeleitete Größe liegt bei 15 900 d (Gray und Goeddel, 1983). Die Größenunterschiede beruhen wahrscheinlich auf Glykosylierung oder Aggregation. Auf Grund der Proteinsequenz ist nur eine intramolekulare Schwefelbrücke möglich, wohingegen IFN-α und ß wahrscheinlich zwei Schwefelbrücken haben (Zwarthoff et al., 1985). Wie im Humansystem haben auch die Typ I Interferone einen gemeinsamen Rezeptor, der sich von dem des IFN-γ unterscheidet.

Interferone zeigen ein weites Wirkungsspektrum, das sich in antivirale Wirkungen und nicht-antivirale Wirkungen unterscheiden läßt. IFN-induzierte antivirale Mechanismen haben nicht nur einen Ansatzpunkt, sondern unterbinden in IFN-behandelten Zellen praktisch jede Stufe der Virusreplikation von Penetration über Replikation und posttranslationelle Prozesse bis zum Wiederaustritt des Virus aus der Wirtszelle. IFN induziert die antivirale Resistenz. Die Art und Weise, wie sie erzeugt wird, hängt aber von der jeweiligen Zellpopulation ab (Stewart und Lockart, 1970). Verschiedene Typen von IFN können ähnliche Mechanismen der antiviralen Aktivität induzieren (Vilcek et al., 1977).

Am besten untersucht ist die IFN-induzierte 2'-5'(A)n Synthetase-RNase Enzymkaskade. Sie wird durch IFN induziert und durch doppelsträngige RNA aktiviert (Lengyel, 1981). Als erster Enzym aktiviert die 2'-5'OligoA-Synthetase, die über ihr Produkt ein zweites Enzym, die RNase L (Ratner et al., 1978; Hovanessian und Kerr, 1979), eine Endoribonuklease. Sie spaltet einzelsträngige virale und zelluläre RNA. Das dritte Enzym, eine 2'-5' Phosphodiesterase, degradiert das gebildete 2'-5' Oligoadenylat und schließt damit den Regelkreis (Williams et al., 1978). Zum anderen wird durch IFN und doppelsträngige RNA ein weiteres Enzym, eine Proteinkinase, induziert und aktiviert (Lebleu et al., 1976). Sie phosphoryliert und inaktiviert

dadurch den Initiationsfaktor der Translation, eIF-2. Es kommt dadurch zu keiner Proteinbiosynthese von viralen und zellulären Proteinen. Neben den antiviralen Wirkungen besitzen alle Interferone einen antiproliferativen Effekt. IFN führt zu reduzierten Wachstumsraten, z.B. in lymphoblastoiden Daudi Zellen (Evinger et al., 1981). Ein weiterer Effekt ist die Aktivierung von Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen zu verstärkter Phagozytose oder Lyse Virus-infizierter Zellen oder Tumorzellen. Auch die Organisation des Zytoskeletts wird durch IFN beeinflußt. Das bewirkt unter anderem eine verstärkte Zelladhäsion und verringerte Zellmobilität (Bourgeade et al., 1981).

Zu den immunmodulatorischen Wirkungen von IFN gehören neben der Aktivierung der spezifischen Zytotoxizität auch verstärkte Antikörperbildung (Gisler et al., 1974) oder verstärkter Abstoßung von Transplantaten (Chernyakhovskaya und Slavina, 1972) und Tumorzellen.

Interferone sind in Vertebraten weit verbreitet. Man findet sie vom Knochenfisch bis zum Menschen. IFN-α und IFN-β entstanden wahrscheinlich vor etwa 310 Millionen Jahren (Taniguchi et al., 1980). DNA-Hybridisierungsexperimente zeigten, daß Fische und Amphibien IFN-β verwandte Sequenzen besitzen, IFN-α verwandte Sequenzen konnten nur in Vögeln, Reptilien und Säugern nachgewiesen werden (Wilson et al., 1983). Die Aufspaltung der IFN-α Subfamilie liegt etwa 26 Millionen Jahre zurück (Miyata und Hayashida, 1982). IFN-γ zeigt keine Homologie in der Aminosäuresequenz zu IFN-α oder IFN-β (Gray et al., 1982a,b) und ihre evolutionäre Verwandtschaft bleibt unklar.

IFN-α und IFN-β haben dennoch Gemeinsamkeiten. Beide zeigen antivirale wie antiproliferative Effekte. Sie sind aber auch in die durch Lymphokine mediierten Modifikationen von Zellen des Immunsystems (Aktivierung von Makrophagen oder T-Zellen) eingebunden. So können T-Zellen durch Typ I Interferone zur Produktion von Typ II Interferon angeregt werden, das wiederum auf die Typ I-Interferon bildende Zelle ("Makrophage") zurückwirkt.

1.2. Zielsetzung

In menschlichen Zellen wird auf Stimulus in Leukozyten vorwiegend IFN-α und in Fibroblasten IFN-β erzeugt. Bei der Induktion in der Maus jedoch werden meist beide IFN Subtypen gleichzeitig induziert, wenn auch in Abhängigkeit vom Zelltyp in unterschiedlicher Zusammensetzung. In Fibroblasten, wie in C243-Zellen, aber auch in Leukozyten, unter anderem in Makrophagen, konnten nach Induktion beide IFN-Subtypen nachgewiesen werden (DeMaeyer-Guignard et al., 1978; Maehara et al., 1977). Im Gegensatz zu menschlichem IFN des Typ I (α und β), das nicht oder nur schwach glykosyliert ist, konnte gezeigt werden, daß Typ I Interferone der Maus Glykoproteine sind (Fujisawa et al., 1978; Fujisawa und Kawade, 1981). Reine Makrophagenkulturen produzieren nach Induktion hauptsächlich IFN-β. Makrophagen beteiligen sich an der zellvermittelten unspezifischen Primärabwehr von Infektionen. Makrophagen sind aber auch integrale Elemente des retikuloendothelialen Systems (RES). Sie erzeugen neben einer Vielzahl von Substanzen auch IFN. Makrophagen, als zellulärer Bestandteil, und Interferone, als ihr Produkt, spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr.

Untersuchungen an Makrophagen hatten ursprünglich den Nachteil, daß sie nur unvollständig (z.B. durch Plastidadhärenz) von anderen Zellpopulationen abgetrennt werden konnten (Maehara et al., 1977). Durch Kultivierung von Knochenmarkszellen in "colony stimulating factor 1" (CSF-1) haltigem Kulturmedium ist es jedoch möglich, reine Kulturen von Makrophagen in größeren Mengen zu züchten (Meerpohl et al., 1976). In den Zellen dieser Primärkultur lassen sich hohe IFN-Titer erzeugen, die denen im Serum von Tieren erzeugten entsprechen. Da andere Zellen (B- und T-Zellen), die wie Makrophagen ebenfalls im gesamten Körper vorkommen, aber kaum IFN bilden können und die Produzentenzelle des Seruminterferons noch nicht identifiziert ist, könnten Makrophagen als Produzentenzelle in Frage kommen. Als potenter Induktor erwies sich 10-Carboxymethyl-9-Acridanon (CMA). Es bietet als niedermolekulare Substanz einige Vorteile gegenüber viralen Induktoren. Es induziert hohe IFN Titer, zeigt eine relativ geringe Toxizität, ist gut löslich, dialysierbar und zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Induktoren durch große Stabilität aus (Storch und Kirchner, 1982; Taylor et al., 1980). Die Charakterisierung des in Makrophagen induzierten IFN sollte zeigen, ob die induzierten Interferone ebenfalls heterogen sind, d.h. ob, wie in allen bislang untersuchten Mauszellen, sowohl α als auch β IFN nachgewiesen werden konnte. Dabei setzten wir neben CMA auch andere Induktoren

ein und charakterisierten die erzeugten Interferone anhand ihrer Antigenität und ihrer Molekulargewichte. In diese Charakterisierung sollten auch die in vivo induzierten Interferone miteinbezogen werden, insbesondere die durch NDV induzierten frühen und späten Interferone.

Mäuse, mit NDV induziert, produzieren hohe Titer an IFN, wobei frühes IFN (2-3 h) und spätes IFN (6-9 h) unterschieden werden kann. Die Produktion des frühen IFN ist eine Funktion von strahlungsresistenten Zellen, d.h. in selbst mit hohen Dosen bestrahlten Tieren konnte nach NDV-Induktion dieses IFN noch erzeugt werden. Im Gegensatz dazu waren die Tiere nach Bestrahlung nicht mehr in der Lage, nach Induktion mit NDV das späte IFN zu bilden. Dadurch könnte man auf unterschiedliche Zellpopulationen schließen, die an der Synthese des frühen und späten IFN beteiligt sind.

Biochemische Methoden, wie hydrophobe Affinitätschromatographie und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) sollten in unserer Arbeit eingesetzt werden. Zum anderen wollten wir die IFN Gen-Expression auf RNA-Ebene untersuchen. Davon ausgehend wollten wir die Regulation der IFN-Induktion genauer untersuchen. Mit Hilfe von Northern und Dot Blots sollten Kinetiken der IFN-Expression und deren Quantifizierung aus Gesamt RNA von Makrophagen durchgeführt werden. Zum Nachweis der in Einzelzellen induzierten IFN mRNA wurde die in situ Hybridisierung eingesetzt, die zeigen sollte, wie stark die einzelne Zelle an der IFN-Gesamtantwort beteiligt ist, ob gleiche Mengen an spezifischer mRNA in allen Zellen oder ob es eine graduelle Abstufung der Expression von Interferon gibt. Durch Charakterisierung der IFN Proteine wurde der Frage nachgegangen, welche Interferone auf Induktion in Makrophagen gebildet werden und ob es Zusammenhänge zwischen in der Produzentenzelle in vivo und in Makrophagen (in vitro) erzeugten IFN gibt. Bei der Analyse der IFN mRNA hingegen stellten sich die Fragen nach dem Verlauf, Ausmaß und der Regulationsstelle der IFN-Induktion in Makrophagen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Die Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen, Einmalspitzen und variable Mikropipetten von Abimed (Düsseldorf) oder Eppendorf (Hamburg).

2.1.1. Zellkultur

Die Medien wurden von Gibco (Mainz), ebenso wie die Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Ampicillin, Gentamycin), Glutamin, essentielle und nichtessentielle Aminosäuren, bezogen. Die Firmen Becton & Dickinson (Oxnard, CA, USA) und Greiner (Nürtingen) lieferten die Plastikwaren.

Zellkulturzusätze: Pferdeserum und fötales Rinderserum (Congo Lab. Division, Wiesbaden)
Farbstoff: Hoechst 33258 (Sigma, München)
Polyethylenglykoll 1000 ultrapure (Sigma, München)

2.1.2. Interferoninduktoren

10-Carboxymethyl-9-acridanon Natriumsalz (CMA, Hoffmann-LaRoche, Nutley, USA)
Newcastle Disease Virus (NDV, Kumarov Strain)
Polyinosyl-polycytidylsäure (PIC, Pharmacia, Freiburg)
Tunicamycin (Sigma, München)

2.1.3. Zellinien

L929580 (Mausfibrosarkomlinie)
Rita (Affennierenzellen)
BUD-8 (menschliche Hautfibroblasten, ATCC CRL 1554)
Foreskin Fibroblasts (menschliche Vorhautfibroblasten)

2.1.4. Viren

Encephalo-myokarditis-Virus (EMCV, F. Besancon, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Frankreich)
Sendai Virus (Parainfluenza Virus 1, Stamm Sendai/Cantell, ATCC VR-907)

2.1.5. Antiseren gegen Interferon

gegen IFN-α von Y. Kawade (Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellt
gegen IFN-α/β und IFN β von Stratech (London, Großbritannien) bezogen.

2.1.6. Interferon

Stratech (London, Großbritannien)

Referenzinterferon, NIH-Standard Nr. G002-904511, Bethesda, MD, USA

2.1.7. Säulenchromatographie

CH-Sepharose 4B (Pharmacia Freiburg)

2.1.8. gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Eichproteine als DMVI von Sigma (München) bezogen.

2.1.9. Interferonklone der Maus

pMIF 1204 partielle IFN-α_2 cDNA (DeMaeyer, Orsay, Frankreich)

pMß-3 IFN-ß cDNA (Y. Kawade, Kyoto, Japan)

genomisches Interferon α_1, α_2, α_4, α_6 (E. Zwarthoff, Rotterdam, Niederlande).

2.1.10. Bakterien

E. coli. C600 (Appleyard, 1954)

E. coli JM 101 (Yanisch-Peron, C, 1985)

2.1.11. Vektoren

pBR 322 (Bolivar et al., 1977; Sutcliffe, 1978)

pBR 328 (Soberon et al., 1980)

Bluescribe M13$^+$ (Helfman, D,M, 1983)

pGem1 (Melton et al., 1984)

2.1.12. Kontrollklone

H-2K^k (Arnold et al., 1984)

Maus α-Aktin cDNA (S. Mittnacht, Heidelberg)

2.1.13. Molekularbiologische Methoden

Enzyme und Feinchemikalien wurden von Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) oder von BRL (Bethesda Research Lab., Bethesda, MD, USA) bezogen, die Mikrogefäße von Eppendorf (Hamburg).

Oligo dT-Cellulose (Pharmacia, Freiburg)

Bisacryl-Cysteamin (BioRad, München)

Ionenaustauscherharz Amberlit (Serva, Heidelberg)
Nylonmembran Gene Screen^{TM} (NEN, Dreieich)
Agarose (Bethesda Research Lab., Bethesda, MD, USA)
DNA aus Heringssperma (Sigma, München)

2.1.14. in situ Hybridisierung
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES, Aldrich, Steinhaus)
Rubber-Cement Fixogum (Marabu, Tamm)
Fotoemulsion NTB2 (nucleartrack emulsion, Kodak, Rochester, NY, USA)
Entwickler Kodak D19 (Kodak, Chalon, Frankreich)
Fixierer Il2 (Ilford, Cheshire, Großbritannien)
Unifix (Kodak, Chalon, Frankreich)

2.1.15. Radioaktiv markierte Nukleotide
α^{32}P NTP, α^{32}P dNTP (Amersham Buchler, Braunschweig)
α^{35}S dNTP (New England Nuclear, Dreieich)

2.2. Tiere

In allen Experimenten wurden Tiere des Inzuchtstamms C57BL/6 (Zentrum für Versuchstiere, Hannover) eingesetzt. Die Mäuse waren männlich, 6 bis 12 Wochen alt und etwa 20 g schwer.

2.3. Interferoninduktion in Knochenmarksmakrophagen

2.3.1. Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen (Havell und Spitalny, 1980)

Tibia und Femur werden Mäusen entnommen und zweimal in HBSS gewaschen. Nach Abschneiden der Knochenenden kann das Knochenmark durch Einführen einer sterilen Kanüle (Nr. 17) in den Knochenmarkskanal mit HBSS unter Druck in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gespült werden. Die Knochenmarkszellen werden mit einer Pasteurpipette resuspendiert und durch Zentrifugation von 30-45 sec bei 150 g von größeren Bestandteilen, wie Knochensplittern abgetrennt. Der Überstand wird abgenommen und 15 min bei 450 g die Knochenmarkszellen pelletiert. Anschließend verwirft man den Überstand und resuspendiert das Pellet in 10 ml KM-Medium.

Knochenmarksmedium (KM-Medium):

RPMI 1640
1% Glutamin
1% Gentamycin
1% essentielle Aminosäuren
1% nicht essentielle Aminosäuren
20% L929-Zellüberstand (Überstand von 5 bis 6 Tage alten L929-Zellkulturen)
7,5% FBS
5% Pferdeserum

Die Zellen werden gezählt und in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml Medium in unbeschichtete Petrischalen ausgesät, entspricht etwa 4×10^4 Zellen/cm^2. Vom 5. Tag an werden die Zellen jeden zweiten Tag gefüttert bis sie nach 7 bis 8 Tagen aus reinen Makrophagen bestehen und zu Versuchen eingesetzt werden können.

2.3.2. Unspezifische Esterase (Koski et al., 1976)

Makrophagen lassen sich anhand einer fluoridhemmbaren Esterase in einem zytochemischen Test nachweisen. Die Zellpräparate können, entweder als Ausstrich oder als auf Objektträger transferierte Zellen, gefärbt werden. Die Präparate müssen lufttrocken sein. Sie werden mit 29,6 ml Phosphatpuffer (0.15 M, pH 6.3), 0.18 ml Pararosanilin/Natriumnitrit-Gemisch und schließlich mit 2 ml α-Naphtylbutyrat versetzt.

a) Pararosanilin-Hydrochlorid (Fuchsin, Serva 21915): 4%ig in warmer 2 N HCl lösen, filtrieren und bei 4^oC lagern

b) Pararosanilin und Natriumnitrit (4%ig) im Verhältnis 1:1 mischen und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren.

c) α-Naphtylbutyrat (Serva 30069) 2% in N-N-Dimethylformamid, in dunkler Flasche bei -20^oC lagern.

Die Inkubation der Zellpräparate dauert bei 37^oC etwa 45 min. Nach Beendigung spült man die Präparate unter fließendem Wasser. Nach dem Trocknen der Zellen werden sie 10 bis 15 min mit Methylgrün (0.5%) bei Raumtemperatur gegengefärbt. Nach der Färbung enthalten Makrophagen rotbraune Granula in unterschiedlicher Dichte. Reife, d.h. ausdifferenzierte Makrophagen lassen sich besonders gut anfärben.

2.3.3. Interferoninduktion

Die Induktion erfolgt mit 10-Carboxymethyl-9-acridanon (CMA), Natriumsalz, Newcastle Disease Virus (NDV) oder Polyinosinsäure-polycytidylsäure (PIC). Nachdem die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen sind, wird CMA in RPMI 1640 mit 2.5% FBS in einer Endkonzentration von 500 µg/ml auf die Zellen gegeben. Die Inkubation dauert solange, bis der Überstand der Interferonbestimmung oder die Zellen einer weiteren Verwendung wie RNA-Präparation zugeführt werden. Andererseits wird der gleiche Effekt durch einen "Puls", das heißt eine ein- bis zweistündige Induktion erreicht. Die Induktion mit PIC erfolgt bei einer Konzentration von 100 µg/ml in RPMI 1640 mit 2.5% FBS, mit NDV bei 0.1 ml/ml RPMI 1640 serumfrei. Unverdünntes NDV hatte einen Hämagglutinationstiter von 2^{10}. Die Induktion erfolgt als "Puls" und die weitere Inkubation in RPMI 1640 mit 2.5% FBS bis die Überstände auf den Interferongehalt ausgetestet werden.

2.4. Interferon-Test

Die CPE-Inhibitonsmethode (cytopathischer Effekt, Finter et al., 1969) stellt die Methode der Wahl dar, da mit ihr relativ einfach die Interferontiter vieler Proben gut reproduzierbar ermitteln lassen.

2.4.1. Anlegen der L-Zellen

Mäusefibroblasten (L929580) werden in Vierkantflaschen (Rouxflaschen) in BME mit 10% FBS kultiviert. Der Überstand wird abgenommen und kann als L-Zellüberstand dem KM-Medium beigesetzt werden. Der Überstand enthält einen Wachstumsfaktor (colony stimulating factor, CSF) für Makrophagen. Nach zweimaligem Waschen mit serumfreiem Medium wird der Zellrasen für 30 sec mit ca. 10 ml 0.05% Trypsin, 0.02 M EDTA bei Raumtemperatur, und dann nach Abschütten der Trypsin-EDTA-Lösung für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10% FBS in 10 ml D-MEM wird die Reaktion abgebrochen und die sich ablösenden Zellen nach mehrmaligem Drücken durch eine Pipette in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen sät man 100 µl-weise in 96-Lochplatten aus. In jedem Loch befinden sich 4×10^4 Zellen. Nach ca. 24 h bei 37°C, 5% CO_2 und 80% Luftfeuchtigkeit liegt ein konfluenter Zellrasen vor und die Zellen können dann für den Test eingesetzt werden.

2.4.2. Applikation der Zellüberstände in den Interferontest

Von jeder Probe gibt man als Doppelwert je 50 µl auf die Reihe 1 und 7 einer 96-Lochplatte (enthält L-Zellmonolayer, 2.4.1.). In 3-er Verdünnungsschritten entsteht mit Hilfe einer 8-Kanalpipette (Multichannel Finnpipette, Gibco, Mainz) eine 6-stufige Verdünnungsreihe von 1:3 bis 1:721. Einige Löcher werden nicht mit Kulturüberstand inkubiert. Sie dienen zum einen als Zell- oder Viruskontrolle oder werden mit Referenzinterferon als Standard versetzt, mit dessen Hilfe die Interferontiter in internationale Einheiten umgerechnet werden können.

2.4.3. Infektion der Zellkulturen

Als Indikatorvirus dient Enzephalomyokarditis-Virus. Es induziert selbst kein Interferon in L929-Zellen und ermöglicht so die korrekte Ermittlung der Interferonaktivitäten. Nach 4 bis 6 h bei 37°C werden die Zellüberstände abgekippt und die Zellen mit 100 µl EMCV (MOI von 0.1) in D-MEM mit 2.5% FBS infiziert. Einige Löcher der 96-Lochplatte erhalten nur Medium ohne Virus und verkörpern die Zellkontrolle, also 0% CPE. Andere Löcher, die kein Interferon enthalten, werden mitinfiziert und stellen die Viruskontrolle dar, also 100% CPE. Dadurch läßt sich der Test von seiner Biologie her überprüfen.

2.4.4. Auswertung des Interferontests

Bei der CPE-Inhibitionsmethode liegt der Endpunkt der Titration und damit der Interferontiter in der Verdünnungsstufe, in der es noch einen 50%igen Schutz des Zellrasens gegen eine Virusdosis gibt, die ohne Interferonvorbehandlung einen 100% CPE, das heißt völlige Zerstörung des Zellrasens, zur Folge hätte (entspricht der Viruskontrolle). Die Aktivität an Interferon entspricht dem reziproken Wert der Verdünnung am Endpunkt der Titration. Diese Aktivität wird in Units (U) angegeben. Durch Vergleich mit NIH-Standards lassen sich die Interferonunits in international Units (IU) umrechnen.

2.5. Virusaufarbeitung und Konzentrationsbestimmung

2.5.1. Enzephalomyokarditis Virus (EMCV)

Die Vermehrung des EMCV erfolgt in L929-Zellen. Hochtitrige Virusstocks werden durch Infektion subkonfluenter Monolayer mit einer MOI von 0.1 erreicht. Rouxflaschen werden mit etwa 30 ml pro Flasche für 1 h bei 37°C infiziert.

Danach kippt man das virushaltige Medium ab und ersetzt es durch ein gleiches Volumen Medium mit 10% Serum. Für weitere 20 h kann das Virus bei 37°C replizieren. Das entspricht etwas mehr als 2 Replikationszyklen à 8 h. Sollte eine vollständige Zellyse vorliegen, werden die Flaschen bei -70°C eingefroren. Durch zweimaliges Frieren und Tauen können die Zellen aufgeschlossen und Viruspartikel aus den Zellen freigesetzt werden. Eine Zentrifugation bei 1000 g trennt Zelltrümmer von Virionen. Die Viruspräparation mit einem Titer von 5×10^7 - 2×10^8 pfu wird in Aliquots bei -70°C gelagert, bis sie z.B. als Indikatorvirus im Interferontest verwendet wird.

2.5.2. Hämagglutinationstest (Jameson et al., 1977)

Dieser Test erlaubt eine schnelle und einfache Methode zur Quantifizierung der Viruskonzentration. Sie beruht auf der Bestimmung der Gesamtmenge an viralen Partikeln (infektiöse wie nichtinfektiöse) und resultiert in der Eigenschaft mancher Viren, rote Blutzellen bestimmter Spezies dreidimensional zu vernetzen. EMCV besitzt diese Eigenschaft in bezug auf menschliche Erythrozyten. Der Hämagglutinationstest auf NDV läßt sich analog unter Verwendung von Hühnerblut durchführen.

HA-Puffer (Boratpuffer): 50 mM Borsäure
120 mM KCl
0.1% BSA (Fraktion V)
mit 1 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt

10%ige Erythrozytensuspension:
2-4 ml heparinisiertes Blut der Gruppe 0, 3mal mit PBS gewaschen und pelletiert (5 min bei 300 g)
Das Erythrozytenpellet in 10 Ursprungsvolumen HA-Puffer aufnehmen.
Die Suspension bleibt 4 Tage bei 4°C verwendbar.

Der Test wird in unbeschichteten 96-Lochplatten (V-Form) durchgeführt. 50 µl einer entsprechenden Virusverdünnung werden mit 50 µl HA-Puffer 1:2 verdünnt. Schließlich kommen noch 50 µl der Erythrozytensuspension zu den Virusverdünnungsstufen. Der Ansatz wird 30 min bei 4°C inkubiert und dann ausgewertet. Die hämagglutinierenden Einheiten (HA Units) eines Virus ergeben sich aus der Verdünnungsstufe, bei der die Erythrozyten noch vernetzt werden und sich nicht als punktförmiges Pellet am Boden absetzen. Unter standardisierten

Bedingungen können HA-Units in pfu umgerechnet werden. In unserem System entsprachen 1000 HA Units etwa 10^8 TCID/ml (tissue culture infectious dosage) in der Endstufentitration. Das Assay besitzt somit eine Nachweisgrenze von 2×10^6 TCID EMCV/ml.

2.5.3. Plaqueassay

Um die Konzentrationsbestimmung von Viren durchführen zu können, nützt man ihre Fähigkeit aus, in Monolayern Plaques zu erzeugen. Über die Zahl der Plaques ermittelt sich die Viruskonzentration als pfu. Es können Konzentrationen von RNA-Viren wie EMCV oder VSV (Vesicular Stomatitis Virus) oder DNA-Viren wie HSV bestimmt werden. Test-Zellen sind RITA-Zellen (Affennierenzellen). Jeder Ansatz enthält 10^6 Zellen in 2 ml und wird in eine 6-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wird der Überstand abgenommen und der Monolayer mit 0.1 ml der entsprechenden Virusverdünnung für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach kommen 2 ml CMC-Medium auf die Zellen. Nach etwa 48 h haben sich Plaques gebildet. Die Zellen werden in 4% Formalin fixiert und mit 1% Kristallviolettlösung gefärbt. Die Zahl der Plaques hochgerechnet mit der Virusverdünnung ergibt ihre pfu/ml.

CMC-Medium:
- 2x BME
- 2.5% FBS
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% Glutamin
- 2% Carboxymethyl-Cellulose

2.6. Charakterisierung der Interferone

Die Interferonsubtypen werden durch Neutralisation mit Antikörpern charakterisiert. Polyklonale, monospezifische Antikörper gegen Interferon α und β wurden verwendet. Antikörperpräparationen gegen Interferon α hatten eine Konzentration von 40 000 neutralisierenden Einheiten (nU)/ml und gegen Interferon β 25 000 nU/ml. Die beiden Antikörperseren zeigten keine Kreuzreaktivität und neutralisieren spezifisch die entsprechenden Interferonsubtypen der Maus. Die Referenzinterferone α und β werden auf theoretische 50 Einheiten pro Ansatz eingestellt und mit der doppelten Menge an neutralisierenden Einheiten inkubiert. Die Interferonproben werden auf einen Titer von etwa 50 Einheiten pro Ansatz

eingestellt und mit zunehmenden Mengen an neutralisierenden Einheiten versetzt. 0, 5, 10, 20, 50 und 100 neutralisierende Einheiten Endkonzentration werden eingesetzt. Das entspricht für Antikörper gegen IFN α einer Verdünnung von 1:100 bis 1:2000 und für Antikörper gegen IFN β einer Verdünnung von 1:75 bis 1:1250. Jeweils 50 µl Interferon beziehungsweise Antikörper werden bei Raumtemperatur 1 h inkubiert und im Interferontest auf Restmengen an aktivem Interferon bestimmt.

2.7. Somatische Fusion von Monolayerzellen zur Herstellung von Mensch-Maushybriden

2.7.1. Kultivierung menschlicher Fibroblasten (BUD-8)

Sie waren bei -70°C bei einer Konzentration von 5-7 x 10^5 Zellen/ml in MEM 20% FBS und 10% DMSO eingefroren. Die tiefgefrorenen Zellen (1-1,5 ml) werden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und langsam und unter stetigem Schütteln mit 5 ml Zellkulturmedium versetzt, bei Raumtemperatur für 10 min bei 450 g zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in 7.5 ml Medium aufgenommen und in eine 15 cm^2 Flasche ausgesät.

BUD-8-Medium:
- MEM
- 10% FBS
- 1% Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% nichtessentielle Aminosäuren

Jeden zweiten Tag erhält die Zellkultur frisches Medium. Sie erreicht nach 7 bis 10 Tagen Konfluenz und kann dann umgesetzt werden. Der Überstand wird dekantiert, für 20 Sekunden mit 3 ml TV (0.05% Trypsin, 0.02% EDTA in PBS) und nach Absaugen von TV 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von serumhaltigem Medium stoppt die Trypsinierung der Zellen. Eine Einzelzellsuspension entsteht nach mehrmaligem Resuspendieren. Die Zellen werden gezählt und in 2 75 cm^2 Flaschen à 15 ml Medium mit etwa 5 x 10^4 Zellen/ml ausgesät. Menschliche Vorhautfibroblasten werden wie BUD-8 Zellen kultiviert und umgesetzt. Anstelle von MEM wird D-MEM als Kulturmedium eingesetzt.

2.7.2. Erzeugung von Mensch-Maus-Hybriden

2.7.2.1. Vorbereitung der Monolayerzellen

a) Makrophagen der Maus:

Die 7 bis 10 Tage alten Makrophagen werden mit serumfreiem RPMI 1640 gewaschen und mit eiskaltem PBS bei $4^{o}C$ inkubiert. 5 ml PBS genügen für eine unbeschichtete 60 cm^2 Petrischale. Nach etwa 15 min lassen sich die Zellen gut mit einer Pasteurpipette vom Plattenboden abspülen. Die Makrophagen werden für 15 min mit 450 g bei $4^{o}C$ zentrifugiert, das Zellpellet in KM-Medium resuspendiert, gezählt, auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und ausgesät.

b) Fibroblasten des Menschen (BUD-8-Zellen)

Die Zellen werden wie bei 2.7.1. beschrieben behandelt. Nach der Zentrifugation für 15 min mit 450 g bei $4^{o}C$ wird das Pellet in KM-Medium aufgenommen, auf die erforderliche Zellzahl eingestellt und ausgesät.

2.7.2.2. Anlegen der Zellen für die Fusion

a) Kontrollansätze

BUD-8-Zellen und Makrophagen werden in 3 ml mit einer Zellzahl von 2.5×10^5 Zellen/ml in 6-Lochplatten ausgesät. Das Medium für beide Zellinien ist das in 2.3.1. beschriebene KM-Medium.

b) Fusionsansatz

In gleichem Medium werden BUD-8-Zellen mit einer Konzentration von 6×10^4 Zellen/ml und Makrophagen mit $1{,}8 \times 10^5$ Zellen/ml angelegt. Die Zellen werden in einem Röhrchen gemischt und à 3 ml in 6-Lochplatten ausgesät. Gleichzeitig werden die fusionierten und nichtfusionierten Zellen auf Deckgläschen (Ø 1 cm) kultiviert und nach 24 h beziehungsweise 48 h fixiert und gefärbt.

2.7.3. Fusionsbedingungen

Nach 24 h werden die Monolayer dreimal mit D-MEM gewaschen und die nicht fusionierten Kontrollen wieder mit KM-Medium versetzt. Ein Drittel der Ansätze wird für 20 sec mit Fusionsmedium I und ein weiteres Drittel für 90 sec mit Fusionsmedium II versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 erhalten die Zellen wieder KM-Medium. Bis zur Induktion inkubieren die Zellen bei $37^{o}C$, 5% CO_2 und 80% Luftfeuchtigkeit.

Fusionsmedium I: D-MEM
10% DMSO
45% Polyethylenglykoll 1000

Fusionsmedium II: D-MEM
50% Polyethylenglykoll 1000

2.7.4. Fixieren der Zellen mit Ethanol-Eisessig

Die Zellen auf den Deckgläschen werden in einem frisch hergestellten Gemisch aus 7 Teilen Ethanol und 3 Teilen Eisessig bei 0^{o}C für 5 min fixiert. Anschließend werden die Präparate zweimal 5 min in eiskalter PBS gewaschen und über eine aufsteigende Ethanolreihe (je 5 min bei 70% und 95% Ethanol) entwässert. Die Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur.

2.7.4.1. Färben der Zellen

Um die Fusionseffizienz in etwa zu ermitteln, wird die DNA (A-T-reiche Satelliten-DNA bei Mäusen) mit dem Höchstfarbstoff 33258 angefärbt. 10 µl einer 100 µg/ml Stammlösung kommen auf 1 ml PBS/50% Glycerin, das entspricht etwa 1 ng Farbstoff pro Präparat. Die Präparate werden in der Lösung eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch (Zeiss, Oberkochen, Filter G365) ausgewertet. Zur Photodokumentation wird der für das Mikroskop vorgesehene Photozusatz mit Belichtungsautomatik verwendet. Als Filmmaterial dient Kodak Tri-X-Pan, ASA 400/27 Din. Die Filme werden in einem Zweibadentwicklersystem (Diafine, FA. Ampfine, Chicago, Illinois, USA) bei 21 bis 24^{o}C entwickelt.

2.7.5. Induktion der Zellen

Nach 24 bzw. 48 h werden die Zellen mit CMA und Sendai-Virus induziert. CMA (500 µg/ml in RPMI 1640, 2,5% FBS) bleibt für die gesamte Dauer der Induktion auf den Zellen. Die Induktion mit Sendai (0,5 ml) erfolgt für 1,5 h in einer Verdünnung von 1:100 (2,5-5 x 10^{4} HA Units/ml). Danach werden die Zellen mit RPMI 1640 gewaschen und in RPMI 1640, 2.5% FBS (identisch mit CMA-Induktion) für 18 h inkubiert. Anschließend werden die Überstände abgenommen und auf Mausinterferon durch Titration von L-929 Zellen und auf humanes Interferon durch Titration auf BUD-8-Zellen ausgetestet. Der Interferontest auf L929 wurde wie in 2.4. beschrieben durchgeführt.

2.7.6. Interferontest auf menschlichen Fibroblasten (CPE-Methode)

BUD-8 Zellen werden mit einer Zellzahl von 10^6 Zellen/10 ml in BUD-8-Medium (2.7.1.) auf eine 96-Lochplatte, 100 µl/Loch, verteilt. 24 h später werden die Interferonproben appliziert und bis zur 6-ten Stufe titriert. Nach 4 bis 6 stündiger Inkubation erfolgt die Infektion mit EMCV (MOI 0.1) in D-MEM, 2.5% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin. Nach vollständiger Lyse der Viruskontrolle (Zellen ohne Interferon, nur mit Virus versetzt) werden die Zellen mit 4% Formalin fixiert und mit 1% Kristallviolett gefärbt. Die Auswertung verläuft analog der Interferonbestimmungen auf L-929-Zellen.

2.8. Säulenchromatographie (Davey et al., 1977)

Die CH-Sepharose 4B dient als Säulenmaterial zur Trennung von Interferonaktivitäten. CH-Sepharose 4B besitzt einen 6-Kohlenstoff-Spacer-Arm, mit dem hydrophobes Material in Wechselwirkung treten kann. Die Säule hat eine Länge von 10 cm und einen Durchmesser von 1 cm, somit ein Säulenvolumen von 8 ml. Der Lade- bzw. Äquilibrierungspuffer ist 50 mM Natrium-Acetat pH 5.0, gegen den auch die Interfernproben dialysiert werden. Die Pumpgeschwindigkeit liegt bei 25 ml/h. Ein Volumen von 2 ml (Serum von Mäusen) oder 10 bis 15 ml (Kulturüberstände) umfaßt die auf die Säule aufgepumpten Interferonproben. Die Elution erfolgt mit 20 mM Natrium-Phosphat pH 7.4 und anschließend mit 0.5 M Natriumchlorid in 20 mM Natrium-Phosphat pH 7.4. Mit 50 mM Natriumacetat wird die Säule nachgewaschen. Jeder Säulenlauf hat 40 Fraktionen, mit 2.4 ml pro Fraktion. Im CPE Inhibitionstest werden die Interferonaktivitäten für jede Fraktion bestimmt.

2.9. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen (Laemmli, 1970; Studier, 1973)

Die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen und als Gradientengele von 8 bis 18% Acrylamid (DeMaeyer-Guignard et al., 1978).

Acrylamid-Bis (30:0.8) 30% Acrylamid
0.8% Bis-Acrylamid
in ddH_2O gelöst und lichtgeschützt bei 4^oC aufbewahren

"Lower" Tris pH 8.8	1.5 M Tris-Cl pH 8.8 0.4% SDS
"Upper" Tris pH 6.8	0.5 M Tris-Cl pH 6.8 0.4% SDS
Laufpuffer	25 mM Tris-Cl 182 mM Glycin 0.2% SDS pH 8.3 als 10fach-konzentrierten Puffer ansetzen
APS	10% Ammoniumperoxodisulfat in ddH_2O ansetzen, bei 4°C und im Dunkeln etwa 10 Tage haltbar
TEMED	N,N,N',N' tetramethylethylendiamin, katalysiert die Polymerisation
Probenpuffer	10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 6.8 5% SDS 10% ß-Mercaptoethanol 10% Glycerin 0.05% Bromphenolblau

Die Qualität der Chemikalien (Serva, Heidelberg, BioRad, München) und das exakte Herstellen der Puffer sind entscheidend für die Laufqualität der Gele. Auf ß-Mercaptoethanol wird bei Erstellung des Probenpuffers verzichtet, da es sonst zur Inaktivierung der Interferonaktivität kommt.

Die Matrix des Trenngels wird wie folgt aus den Stammlösungen zusammengemischt (30 ml):

Acrylamidkonzentration	in%	8	10	12	15
ddH_2O	in ml	14,4	12,4	10,4	8,4
Acrylamid-Bis	in ml	8	10	12	15
"Lower" Tris	in ml	7,5	7,5	7.5	7.5
TEMED	in µl	10	10	10	10
APS	in µl	200	200	200	200

Die Obergelmatrix enthält eine Acrylamidkonzentration von 3.9% und setzt sich wie folgt zusammen (10 ml Gemisch):

H_2O	in ml	6.2
Acrylamid-Bis	in ml	1,3
"Upper" Tris	in ml	2.5
TEMED	in µl	10
APS	in µl	100

Bei Gradientengelen verändert sich die im Gradientenmischer erzeugte Acrylamidkonzentration gleichmäßig. Sie wird so in die Apparatur gepumpt, daß am Anfang des Trenngels die niedrigste Acrylamidkonzentration ist. Die Matrix wird aus den Stammlösungen wie folgt zusammengemischt (30 ml):

Acrylamidkonzentration	in %	8	18
ddH_2O	in ml	7,0	1,0
Acrylamid-Bis	in ml	4,0	9,0
"Lower" Tris	in ml	3,9	3,9
Glycerin	in ml	0,11	1,1
TEMED	in µl	5	5
APS	in µl	50	40

Die Elektrophorese wird in einer Vertikalapparatur durchgeführt (Studier, 1974). Die Dimension der Gelmatrix beträgt 14,5 x 18 x 0,15 cm. Die Markerproteine werden mit einem Volumen Probenpuffer (mit ß-Mercaptoethanol) versetzt und 2 min bei 100°C denaturiert. Die Interferon-Proben hingegen inkubieren 25 bis 30 min bei 45°C. Der Gellauf erfolgt stromkonstant mit einer Stromstärke von 25 mA für 8 h oder spannungskonstant mit einer Spannung von 75 V für 15 h. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel gleichzeitig fixiert und gefärbt in

40% Methanol
10% Essigsäure
0.2% Serva Blau R

Nach 3 bis 4 h wird die Farbe abgeschüttet und das Gel entfärbt bis die Matrix fast farblos erscheint in:

10% Methanol
10% Essigsäure

Um die Molekulargewichte der verschiedenen Interferone bestimmen zu können, werden die Gelstücke, in denen Interferone aufgetrennt werden, in 3 mm breite Streifen geschnitten. Die Region mit den Markerproteinen wird angefärbt,

für jedes Protein der Quotient aus Laufstrecke zur Gesamtlaufstrecke gebildet und damit auf einfach logarythmischem Papier eine Eichkurve erstellt.

Eichproteine	Molekulargewicht (d)
Lysozym	14.300
ß-Lactoglobulin	18.400
Trypsinogen	24.000
Pepsin	34.700
Ovalbumin	45.000
Rinderserumalbumin	65.000

2.10. Extraktion der Interferone aus Polyacrylamidgelen (Taira et al., 1980)

Um Interferonaktivitäten mit ihren Molekulargewichten zu korrelieren, müssen die Interferone aus den Acrylamidgelen wieder extrahiert und im antiviralen Assay ausgetestet werden. Die einzelnen Gelspuren werden mit Rasierklingen in 3 mm breite Gelstreifen geschnitten und in Eppendorfgefäße transferiert, die am Boden ein Loch haben. Jedes Gefäß wird auf ein zweites gesetzt und 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Dadurch preßen sich die Acrylamidstreifen durch das Loch, wobei das Acrylamid in kleinste Teile zerlegt wird. Der Acrylamidschlamm wird in Extraktionspuffer resuspendiert und zur Interferonelution über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Extraktionspuffer:
137 mM NaCl
27 mM KCl
8.1 mM Na_2HPO_4
1.5 mM KH_2PO_4
0.1% SDS
10% Glycerin
25 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
PMSF als 50 mM Stammlösung in Methanol bei 4°C

Durch Zentrifugation für 20 min bei Raumtemperatur bei 15 000 g trennt sich das Acrylamid ab und die Überstände dialysieren für 24 Stunden gegen PBS bei 4°C. Danach können sie im CPE-Assay eingesetzt, die biologische Aktivität der einzelnen Gelstreifen ermittelt und mit Hilfe der Eichkurve (2.9) die Molekulargewichtsbereiche bestimmt werden.

2.11. Isolierung von Plasmid DNA

Plasmide werden über alkalische Lyse isoliert (Birnboim und Doly, 1979; modifiziert).

2.11.1. Minipräparation

Zur schnellen Charakterisierung und Verifizierung von Plasmiden werden 2 ml Übernachtkulturen ohne Chloramphenicolamplifikation angelegt. Die gesamte Präparation der DNA erfolgt wie bei Maniatis et al. (1982, S. 368) beschrieben. Abweichend davon findet die Isolierung nicht bei $4^{o}C$, sondern bei Raumtemperatur statt, außerdem folgt nach der Phenolextraktion noch eine Chloroformextraktion, um die Effizienz des sich anschließenden Restriktionsverdaus zu erhöhen.

2.11.2. Maxipräparation

Bei der Massenisolierung von Plasmid DNA wurden 50 ml LB-Medium (Maniatis et al., 1982) mit 0.5 ml Übernachtkultur angeimpft. Nach Eintrit in die logarithmische Wachstumsphase (OD nicht größer als 0.6) wird die Hauptkultur von 0.5 bis 1.0 Liter LB-Medium (mit Antibiotika) mit 30 ml Vorkultur angeimpft und bei $37^{o}C$ geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0.8 bis 0.9 erfolgt die Zugabe von Chloramphenicol (170 µg/ml) zur Amplifikation von Plasmid DNA. Die Kultur wird dann bei $37^{o}C$ über Nacht geschüttelt. Die Zellen werden abzentrifugiert (9000 g, 30 min, $4^{o}C$) und das Pellet in 18 ml Lysozympuffer aufgenommen.

Lysozympuffer: 25 mM Tris-Cl pH 8
50 mM Glucose
10 mM EDTA

Dann erfolgt die Zugabe von 2 ml Lysozym (5 mg/ml) in TE pH 8. Der Ansatz bleibt 10 bis 15 min auf Eis. Der Ansatz wird dann mit 1 Volumen NaOH/SDS (0.2 N bzw. 1% Endkonzentration) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich erfolgt die Zugabe von 15 ml 5 M K-Acetat pH 4.8. Die Lösung wird gründlich gemischt. Durch Zentrifugation (9000 g, 25 bis 30 min, $4^{o}C$) kommt es zur Abtrennung von Proteinen und chromosomaler DNA. Durch die Zugabe von 0.6 Volumen Isopropanol zum Überstand fallen die Nukleinsäuren aus, die wie oben beschrieben pelletiert werden, jetzt jedoch bei Raumtemperatur. Nachdem das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet ist, wird es in 10 ml TE pH 8 aufgenommen, mit Ammonium-Acetat (2 M Endkonzentration) versetzt,

15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 4°C mit 10 000 g zentrifugiert. Hochmolekulare RNA fällt hierbei aus.

Der Überstand wird mit 2 Volumen absolutem Ethanol gefällt, abzentrifugiert mit 70% Ethanol gewaschen, kurz unter Vakuum getrocknet und in 2 bis 3 ml TE pH 8 aufgenommen. Ein Enzymmix aus RNase A (200 µg/ml) und RNase T1 (20 U/ml in H_2O) soll die restliche RNA in einem 3-Stufen Prozeß verdauen, 30 min bei 37°C, 5 min bei 65°C und 15 min bei 37°C. Den Ansatz auf 2 M Ammoniumacetat gebracht, wird mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt und schließlich mit 70% Ethanol gewaschen. Das durch Zentrifugation erhaltene DNA-Pellet wird in CsCl-Lösung (1 mg CsCl auf 1 ml TE pH 8) aufgenommen und mit Ethidiumbromid versetzt (600 µg/ml Endkonzentration). Eine Dichtegradientenzentrifugation (50 000 rpm, 16 Stunden, 20°C in VTI65 mit einer L8-Zentrifuge von Beckman, USA, oder Äquivalent) führt zur Abtrennung superhelikaler DNA. Diese DNA-Bande wird abgezogen und das Ethidiumbromid mit wassergesättigtem Butanol extrahiert. Die hohe Salzkonzentration reduziert sich nach Dialyse der DNA gegen TE pH 8. Schließlich wird die DNA in 0.3 M Na-Acetat mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt.

2.12. RNA-Präparation

2.12.1. Isolierung von gesamtzellulärer RNA (Chirgwin et al., 1979)

Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA werden Zellen mit Guanidiniumisothiocyanat aufgeschlossen und die RNA mit der Pelletierung durch ein CsCl-Kissen gereinigt. Der stark akaotrophe Charakter des Guanidiniumisothiocyanats ermöglicht die Isolierung intakter RNA selbst aus Zellen mit hoher endogener Nukleaseaktivität.

GTC	4 M Guanidiniumisothiocyanat (GTC)
	0.5% Laurylsarcosin
	25 mM Natrium-Zitrat pH 7
	0.7% ß-Mercaptoethanol

Unlösliche Bestandteile werden durch Filtration über Nitrocellulosefilter (45 µm) abgetrennt und der pH mit 1 N NaOH auf 7 eingestellt.

CsCl	5.7 M CsCl
	25 mM Natrium-Acetat pH 5

Die filtrierte Lösung wird mit 0.2% DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt, um Nukleasen zu inaktivieren. DEPC wird durch Erhitzen der Lösung auf 60°C über Nacht zerstört. Alle Glaswaren und Pipettenspitzen können nach Hitzebehandlung (180°C, 4 h) als verpackte Einmalartikel oder als dreifach filtrierte (45 µl Nitrocellulosemembranfilter) Lösungen für die weitere Prozessierung verwendet und als nukleasefrei betrachtet werden.

Monolayerkulturen werden geerntet, indem man das Medium abkippt, die Zellen zweimal in warmem PBS wäscht und in 10 ml eiskalter PBS aus den Kulturschalen kratzt. Nach einmaligem Nachwaschen werden die Suspensionen vereinigt und die Zellen pelletiert (450 g, 15 min bei 4°C). Das Pellet wird noch zweimal gewaschen, dann schnell 10 bis 15 Volumen GTC zur Lyse der Zellen beigegeben. Das mehrmalige Durchdrücken der Lösung durch eine 18er Kanüle führt zur Scherung der hochmolekularen DNA und erniedrigt somit die Viskosität der Lösung. Sie wird in einem Polyallomerröhrchen (14 x 89 mm) auf ein 5 ml CsCl-Kissen geschichtet. Nach 20 h Zentrifugation (31000 rpm, bei 20°C in einer Beckman-Ultrazentrifuge, L8 oder Äquivalent) ist die RNA pelletiert. Vorsichtige Abheberung des Überstandes und Nachwaschen mit GTC soll die Kontamination der RNA mit Proteinen und DNA verhindern. Das RNA-Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, mit 70°C heißem Wasser eluiert und mit 2,5 Volumen Ethanol, 0.3M Natrium-Acetat pH 5.5 präzipitiert.

2.12.2. Isolierung von Poly A^+-RNA

Die Poly A^+ haltige RNA Fraktion wird chromatographisch über Oligo dT-Cellulose aufgereinigt und von ribosomaler RNA abgetrennt.

TE pH 7.6	10 mM Tris-Cl pH 7.6
	1 mM EDTA
NaCl-TE	500 mM NaCl
	10 mM Tris-Cl pH 7.6
	1 mM EDTA

Die Gesamt-RNA wird gefällt (9000 g, 20 min, 20°C), das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE bei 70°C gelöst. Die photometrische Vermessung der RNA erlaubt die Kalkulation ihrer Konzentration (1 OD 260 = 40 µg/ml RNA, bei einem Verhältnis aus 260/280 von 2). Daraufhin wird die Lösung auf ca. 0.5 mg/ml in TE eingestellt. Oligo dT-Cellulose, ent-

sprechend dem dreifachen der notwendigen RNA-Bindungskapazität wird in TE ca. 15 min bei Raumtemperatur gequollen, in 5 ml Einmalspritzen mit Glaswollestopfen gefüllt und am Ausfluß mit einem Dreiwegehahn (Pharmascab, Herstal, Belgien) versehen. Das Säulenmaterial wird mit 10 Volumen TE gewaschen und mit 5 Volumen NaCl-TE äquilibriert.

Nach der Denaturierung der RNA-Lösung bei 85°C erfolgt das Einstellen der Salzkonzentration mit einer 5 N NaCl-Stammlösung auf 0.5 M NaCl. Dann wird die RNA-Lösung auf die Säule geladen (Flußrate ca. 0,5 bis 1 ml/min). Durch zweimaliges Rezyklieren der RNA-Lösung soll sich die Menge an gebundener Poly A^+ RNA erhöhen. Das Säulenmaterial wird nochmals mit 5 bis 10 Volumen NaCl-TE gewaschen. Die gebundene Poly A^+-RNA läßt sich mit TE eluieren und in 1 ml Portionen fraktionieren, wovon ein Aliquot zur Bestimmung der OD 260 abgeht. Die RNA-haltigen Fraktionen werden vereinigt, auf 0.4 M LiCl gebracht, mit 2.5 Volumen Ethanol gefällt und als Ethanolpräzipitat bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.12.3. RNA-Präparation aus geringer Zellzahl

Zum Abklären von Kinetiken ist es wichtig, daß RNA-Präparationen schnell durchgeführt werden und trotzdem ausreichend RNA vorliegt, um eine Charakterisierung im analytischen Gel zu erlauben.
Die Arbeitbedingungen decken sich mit denen in 2.12.1. beschriebenen.

EP (Extraktionspuffer)	0.3 M Natrium-Acetat pH 5
	10 M EDTA
	0.2% SDS
Phenol	Phenol mit 0.3 M Natrium-Acetat pH 5 gepuffert

Das Medium, der in 5 cm Petrischalen kultivierten Zellen, wird abgeschüttet, der Monolayer zweimal mit PBS gewaschen und PBS vollständig entfernt. Die Zellen werden mit 1 ml 70°C heißem Phenol versetzt, die Platte schnell geschwenkt damit sich das Phenol bei möglichst gleicher Temperatur über dem Monolayer verteilt. Danach erfolgt die Zugabe von 200 µl EP, wieder schnelles Schwenken der Platte. Die gesamte Lösung wird in ein 2.5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert, gut durchmischt und nach Zugabe von 1 ml Chloroform wiederum gut durchmischt. Nach Zentrifugation (10 000 g, 2 min bei Raumtemperatur) wird der Überstand, ohne die Interphase zu zerstören, abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Extraktion mit Chloroform wird die RNA mit 1 Volumen 4 M LiCl

bei 4°C über Nacht gefällt. Nach Waschen mit 70% Ethanol kann die RNA weiterverwendet werden.

2.13. Gelelektrophorese

2.13.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

2.13.1.1. Native Agarosegele

Native Agarosegele finden ihren Haupteinsatzbereich in Analysen von DNA-Fragmenten.

TBE	89 mM Tris-Base 89 mM Borsäure 1 mM EDTA pH 8 als 10fach konzentrierten Stock ansetzen und autoklavieren
Probenpuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol 15% Ficoll 60 mM EDTA bei Raumtemperatur aufbewahren und den Proben die 1/6 des Probenvolumens entsprechende Menge zusetzen

Je nach Fragmentgröße variiert die Agarosekonzentration von 0.8 bis 1,5% mit TBE als Elektrophoresepuffer in horizontalen Gelkammern. Präparation der Gele und Durchführung des Laufs wurde, wie bei Maniatis et al. (1982, S. 150ff) beschrieben, durchgeführt. Kurz vor dem Gießen der Matrix kommen 0.5 µg/ml Ethidiumbromid in die Agarose.

2.13.1.2. Polyacrylamidgele

Bei der Insertpräparation werden zur Auftrennung der durch Restriktionsenzyme geschnittenen DNA die Acrylamidgelelektrophorese mit Bisacrylcysteamin (BAC) als Vernetzer verwendet. Der Einsatz von BAC bringt eine höhere Auflösung der DNA-Fragmente in hohen Molekulargewichtsbereichen als herkömmliche Quervernetzer.

Acrylamid/BAC	bei 5 bis 6%igen Gelen kommen auf 8,98 g Acrylamid 1.02 g BAC auf 100 ml Lösungsvolumen; unter Erwärmen löst sich BAC, die Lösung bei Raumtemperatur lichtgeschützt aufbewahren.
Laufpuffer	0.5 x TBE siehe 2.13.1.1.
APS	10% Ammoniumperoxodisulfat in ddH_2O, frisch angesetzt, bei 4°C und lichtgeschützt 10 Tage haltbar
Probenpuffer	siehe 2.13.1.1.

Gelzusammensetzung:

Acrylamidkonzentration	in%	4	5	6
Acrylamid/BAC	in ml	14	17,5	21
10 X TBE	in ml	3.5	3.5	3.5
H_2O	in ml	51,87	48,37	44,87
APS	in ml	0.28	0.28	0.28
TEMED	in ml	0.35	0.35	0.35

Um nicht polymerisierte Bestandteile auszuwaschen, wird eine Vorelektrophorese bei 60 V konstant über Nacht durchgeführt. Die am nächsten Tag aufgetragenen Proben laufen bei konstant 50 V ins Gel, anschließend erfolgt die DNA-Fragment-Auftrennung für 3 bis 5 h bei konstant 200 V. Nach dem Lauf werden die Gele vorsichtig im Laufpuffer mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid für 15 min unter leichtem Schwenken gefärbt.

2.13.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA (MacMaster und Carmichael, 1977)

Die Auftrennung der RNA erfolgt über denaturierende Glyoxal Agarose-Gele.

Glyoxal	als 6 M Lösung in ddH_2O, extensiv deionisiert (AG501-X8, BioRad, München), bei -70°C in Aliquots gelagert
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ultrapure, nach dem Öffnen die Luft mit Stickstoff austreiben, um die Bildung von Oxidationsprodukten zu verhindern, lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahren.
1 M NaP	1 M Na_2HPO_4, mit konzentrierter H_3PO_4 auf pH 7 einstellen, durch 3fache Filtration über Nitrocellulosemembranfilter (0.45 µm) von kontaminierender RNase befreien

Ladepuffer
50% Glycerin
10 mM Na-Phosphat pH 7
0.4% Bromphenolblau

Laufpuffer (TAE)
40 mM Tris
20 mM Na-Acetat
1 mM EDTA
mit Eisessig auf pH 7.2 einstellen
als 40fach konzentrierten Stock ansetzen
und autoklavieren

Die Glyoxylierung wird in hitzebehandelten Eppendorfgefäßen angesetzt.

Glyoxylierungsansatz
2,7 µl Glyoxal
8 µl DMSO
1,6 µl NaP
3,7 µl RNA (bis zu 20 µg) in ddH_2O

Die RNA wird zuvor 5 min bei 80°C denaturiert. Der Ansatz wird 1 h bei 50°C inkubiert, am Ende der Glyoxylierung mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und auf ein 1,8% Agarosegel in TAE geladen. Die Laufbedingungen entsprechen den bei Maniatis et al. (1982, S. 200). Um den pH-Wert im Gel konstant zu halten, wird der Puffer mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe umgewälzt.

Färben der Glyoxalgele:

Die Gele werden 40 min in 50 mM NaOH behandelt, dann zweimal für je 10 min mit Laufpuffer (TAE) neutralisiert, schließlich 10 min Inkubation in Laufpuffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid.

Photographieren Ethidiumbromid-gefärbter Gele erfolgt auf einem UV-Transilluminator (264 nm, 1.4 mW/cm^2) mit einer Sofortbild-Photoeinrichtung (Polaroid MP4) wie bei Maniatis et al. (1982, S. 162) beschrieben.

2.14. Insertpräparation

2.14.1. Restriktionsverdau

Mit dem Einsatz von Restriktionsenzymen kann aus Plasmid-DNA das jeweilige Insert herausgeschnitten werden. Die Plasmidpräparation wird wie in 2.11. beschrieben durchgeführt. Die Bedingungen für Restriktionsverdaus entsprechen genau den Beschreibungen der Hersteller. Native Agarosegele

(2.13.1.1.) können zur Überprüfung der Effizienz der Reaktion herangezogen werden. Die Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 40 mM führt zum Abbrechen der Enzymreaktion.

2.14.2. Polyacrylamidgele (2.13.1.2.)

Nach der Zugabe des Probenpuffers können die DNA-Fragmente auf Acrylamidgele geladen und getrennt werden. Die Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert die DNA, die anschließend aus dem Gel herausgeschnitten wird.

2.14.3. Elektroelution der DNA

Die Elektroelution dient zur Extraktion der DNA aus der Acrylamidmatrix und zur Konzentration in möglichst kleine Volumina. Die DNA steht dann zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

Elutionspuffer	TAE (1x)
Hochsalzpuffer	3.3 M Na-Acetat pH 5.5

Zur Elution wurde die Elektroelutionsapparatur von Biometra (Göttingen) eingesetzt. Die Gelstückchen werden in die für sie vorgesehenene Bohrungen gelegt, so daß sie ganz von Puffer bedeckt sind. In jede Bohrung wird 1 µl Probenpuffer zur Markierung des Elutionsverhaltens gegeben. In den Knicken des V-förmigen Verbindungsstückes zwischen Kathode und Anode befinden sich 50 µl Hochsalzpuffer, in den die DNA nach Anschließen an eine Spannungsquelle einwandern muß und immobilisiert wird. Die Elektroelution läuft ca. 1.5 h bei 100 V. Danach wird der Hochsalzpuffer mit einer Kanüle abgezogen und die DNA mit 2.5 Volumen Ethanol gefällt.

2.14.4. Quantifizierung der DNA

Die weitere Verwendung der DNA setzt eine möglichst gute Quantifizierung der DNA voraus. Der Tüpfeltest ermöglicht eine genauere Quantifizierung als die photometrische Vermessung der OD 260.

Vor der Präzipitation der DNA wird ein Aliquot abgenommen und bis zu einem Volumen von 10 µl mit TE pH 8 aufgefüllt. Von einer DNA mit bekannter Konzentration wird eine beliebige Verdünnungsreihe angesetzt. Eine Ethidiumbromidlösung mit einer Konzentration von 1 ng/µl wird hergestellt. 10 µl dieser Lösung werden auf eine über eine UV-Platte gelegte Haushaltsfolie vorgelegt und die DNA seriell verdünnt (1:2). Durch Vergleich der Endpunkte der Ethidiumbromidfluores-

zenz lassen sich die Konzentrationen und Gesamtmengen der zu quantifizierenden DNA nach Rückrechnung bestimmen.

2.15. Radioaktive Markierung der DNA

2.15.1. Nicktranslation (Rigby et al., 1977)

Das Zusammenwirken von DNase I und E. coli Polymerase I in der Nicktranslation führen zu radioaktiv markierter Doppelstrang-DNA mit hohen spezifischen Aktivitäten.

Die Nicktranslation wird entweder mit den gesamten Plasmiden oder nur mit Inserts durchgeführt. Als radioaktiv markiertes Nukleotid fand $\alpha^{35}S$ oder $\alpha^{32}P$ dNTP Verwendung. $\alpha^{35}S$ dNTP hat eine spezifische Aktivität von 1000 bis 1200 Ci/mmol, $\alpha^{32}P$ dNTP 3000 Ci/mmol.

DNA-Menge	Gesamtplasmid 100-200 ng Insert 30-50 ng
Nukleotide:	2 mM Stammlösung, mit Ausnahme des radioaktiv markierten, 0.1 mM Endkonzentration im Ansatz, Zumischen von nichtradioaktiven Nukleotiden von 80 pmol bei einem radioaktiven $\alpha^{32}P$-Nukleotid; bei $\alpha^{35}S$ markierten Nukleotiden wurde ein 10x Nukleotidmix zusammenpipettiert: 3 µl 2 mM dGTP 2,5 µl 2 mM dCTP 2,5 µl 2 mM dTTP 12 µl 50 mM Tris-Cl pH 7.5
Nicktranslationspuffer	als 10fach konzentrierte Lösung angesetzt (10x NT) 0.5 M Tris-Cl pH 7.2 0.1 M $MgSO_4$ 1 mM Dithiothreitol 0.05% BSA (Fraktion V) bei -20°C aufbewahren
Enzyme	a) DNase I 1:10000 in 1x NT, entspricht 20 pg pro Ansatz DNA-Polymerase I: 10 U b) getesteter "Enzym-Mix" von Amersham (Braunschweig) mit 3U DNA-Polymerase I und 60 pg DNase I pro Ansatz

Standardansatz für ^{32}P markierte DNA

DNA	100-200 ng bzw. 30-50 ng
10 x NT	5 µl
nichtmarkierte dNTP	0.5 µl/Nukleotid
α ^{32}P dXTP	7 µl (70 µCi)
unmarkiertes dXTP	4 µl (80 pmol)
H_2O	auf 44 µl
Enzym-Mix	6 µl

Standardansatz für ^{35}S markierte DNA

DNA	100-200 bzw. 30-50 ng
10x NT	2 µl
DNase I	2,2 µl
DNA-Polymerase I (10 Units)	2 µl
10x Nukleotid-Mix	2 µl
α ^{32}S dXTP	10 µl (100 µCi)
H_2O	auf 20 µl

Die Ansätze werden 1,5 bis 2 h bei 15°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA abgebrochen.

Die Abtrennung markierter DNA von freien Nukleotiden erfolgt wie bei Maniatis et al. (1982, S. 109ff) beschrieben. Die Reaktion liefert im allgemeinen Aktivitäten von 3-5 x 10^8 cpm/µg DNA.

2.15.2. "Oligo-Labeling" (Feinberg und Vogelsang, 1983, mit addendum 1984)

Die Methode beruht auf einer "Primer-Extension"-Reaktion von statistischen Hexanukleotiden an einzelsträngiger DNA durch das Klenow-Fragment der E. coli Polymerase I. Sie wurde mit gereinigten Fremd-DNA-Fragmenten durchgeführt und liefert bei einem Einbau von etwa der Hälfte der radioaktiven Nukleotide spezifische Aktivitäten von 2-5 x 10^9 cpm/µg DNA. Mit Ausnahme bei der "in situ Hybridisierung" wurde diese Methode immer bei der Markierung von klonierter DNA eingesetzt. Puffer und Reaktionsbedingungen sind wie bei Feinberg und Vogelsang (1984) beschrieben. Hauptsächlich werden DNA-Fragmente eingesetzt, die durch Elektroelution aus den Gelen isoliert wurden. Der Reaktionsansatz wird als Ganzes, also ohne vorheriges Abtrennen nicht inkorporierter Nukleotide, zur Hybridisierung eingesetzt. Die Kontrolle des Einbaus erfolgt durch Auszählen

der durch 10% Trichloressigsäure (TCA) gefällten DNA. Die Fällung entspricht der bei Maniatis beschriebenen Methode (1982, S. 473).

2.16. "Blotting" und Hybridisierung

2.16.1. Northernblots (Thomas, 1980)

Spezifische RNA-Sequenzen können mit Hilfe von Northernblots nachgewiesen werden. Die RNA wird über Glyoxalgele aufgetrennt (2.13.2.) und durch Saugtransfer auf eine Nylonmembran übertragen (Gene screen^{TM}). Der Transfer-Aufbau ist wie bei Maniatis et al. (1982, S. 383ff) für Southern Transfers beschrieben. Im Gegensatz dazu wird das Gel nach Abschluß der Elektrophorese ohne jede weitere Vorbehandlung direkt in den Transfer eingesetzt. Die Kontrollspuren, beladen mit ribosomaler RNA, werden vor Transferbeginn abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (2.13.2.). Nach 18 bis 20 h ist der Transfer beendet und die Membran wird für 2 h bei 80°C gebacken, um zum einen die RNA auf der Membran zu fixieren (nur bei Nitrocellulosemembran) und zum anderen die Aufhebung der Glyoxylierung zu erreichen.

Hybridisierungsansatz:
50% Formamid
10% Dextransulfat
1x Denhardt's
5x SSPE
0.1% SDS
100 µg/ml Heringssperma-DNA
bei 42-44°C

Formamid wird zweimal bei 0°C umkristallisiert, entionisiert und in 100 ml Aliquots bei -20°C eingefroren.

50x Denhardt's
1% Ficoll 400
1% Polyvinylpyrrolidon
1% BSA (Fraktion V)

20x SSPE
3 M NaCl
0.2 M NaH_2PO_4
20 mM EDTA
mit NaOH auf pH 7.4 eingestellt

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgt für eine Stunde eine Vorinkubation in 10-15 ml Hybridisierungslösung ohne radio-

aktiv markierter DNA. Die DNA wird 5 min bei 100°C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und danach der Hybridisierungslösung in einer Konzentration von 1-5 x 10^6 cpm/ml zugesetzt. Die Hybridisierung läuft dann über einen Zeitraum von 18-48 h bei konstanter Temperatur. Dann wird die Hybridisierungsflüssigkeit abgeschüttet und die Membran einer Waschprozedur unterworfen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die radioaktive Hybridisierungslösung kann mehrmals verwendet werden, wobei die Halbwertszeit der einzelnen Nuklide in Betracht gezogen werden muß. Zuvor sollte die Probe nochmals für 10 min bei 60°C denaturiert werden.

Waschprozedur:	2mal 5 bis 10 min 2x SSC bei Raumtemperatur
	3mal 20 min 2x SSC, 1% SDS bei 65°C
	2mal 30 min 0.1x SSC bei Raumtemperatur
20x SSC:	3 M NaCl
	0.4 M Na-Zitrat
	mit HCl auf pH 7 einstellen

Der noch feuchte Filter wird auf eine wasserundurchlässige Unterlage gelegt, in Haushaltsfolie eingeschlagen und mit Verstärkerfolie (Cronex^R, Quanta III, DuPont de Nemours, DE, USA) bei -70°C exponiert. Die Filter werden im allgemeinen mehrfach unter Verwendung unterschiedlich markierten Hybridisierungsproben eingesetzt. Das Entfernen von Signalen vorhergehender Hybridisierungen wird entsprechend den Angaben der Membranhersteller durchgeführt.

2.16.2. Dot-Blot-Hybridisierung (Cheley und Anderson, 1983)

Die RNA wird pelletiert, gewaschen (2.12.1.1.) und in 125 µl 15% Formaldehyd aufgenommen. Nach Zugabe von 125 µl 20x SSC (2.16.1.) werden die Proben 15 min bei 50°C erhitzt und 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgt nach Zugabe von 2 µl Probenpuffer (2.13.1.1.) die serielle Verdünnung in 1:2 Schritten mit 10x SSC in 96-Lochplatten. 125 µl werden auf eine mit 10x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Genescreen^{TM}), die auf 2 Filterpapieren liegend in einen Filtrationsapparat (Minifold II, Schleicher und Schüll, Keene, NH, USA) eingespannt ist, aufpipettiert. Der Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe erzeugt in der Filtrationsapparatur ein Vakuum, wodurch die Proben auf die Membran gesaugt werden. Die Membran wird für mindestens 2 h bei 80°C getrocknet. Die Hybridisierungs- und Waschprozeduren erfolgen wie bei 2.16.1. beschrieben.

2.17. **"Run on transcription"** (Groudine et al., 1981; Greenberg und Ziff, 1984)

Bei "Run on transcription" Experimenten werden die Transkriptionsprodukte der DNA zu einem bestimmten Zeitpunkt analysiert. Durch ein in vitro System kann die Transkription unter definierten Bedingungen ablaufen. Die neusynthetisierte RNA wird radioaktiv markiert und mit definierter DNA hybridisiert.

2.17.1. Aufbringen der DNA auf Nylonmembran

Zuerst muß die DNA linearisiert werden, um optimale Hybridisierung mit markierter RNA zu ermöglichen. Pro Ansatz werden ca. 10 µg DNA einem Restriktionsverdau unterworfen (2.14.1.). Anschließend wird die Lösung (mit 50 mM NaOH) 1 bis 1,5 Stunden denaturiert und schließlich mit 2 M NH_4-Acetat neutralisiert. Dann erfolgt das Aufbringen der Proben auf die Nylonmembran (Genescreen^{TM}) wie bei 2.16.2. beschrieben.

2.17.2. Kernpräparation

Zur Erstellung des "in vitro" Systems müssen die Kerne möglichst gut abgetrennt werden.

Lysispuffer (LP)	15 mM Hepes pH 7.5
	60 mM KCl
	15 mM NaCl
	14 mM ß-Mercaptoethanol
	0.5 M EGTA
	5 mM EDTA
	0.15 mM Spermidin
	0.15 mM Spermin
	dazu nach Bedarf 0.4% NP40
Aufbewahrungspuffer (AP)	50 mM Tris-Cl pH 8.3
	40% (v/v) Glycerin
	5 mM $MgCl_2$
	0.1 mM EDTA
	Aufbewahrung der Kerne in flüssigem Stickstoff
2x Reaktionspuffer (2x RP)	70 mM KCl
	5 mM $MgCl_2$
	2.5 mM DTT

0.1 mM EDTA
0.4 mM ATP, GTP, CTP
3-4 µM α^{32}P-UTP
20% (v/v) Glycerin
10 mM Phosphokreatin (Endkonzentration)
10 U/ml Kreatinphosphokinase (Endkonzentration)

Um enzymatische Reaktionen weitgehend zu unterbinden, wird bei der Kernpräparation immer auf Eis gearbeitet.

Nach zweimaligem Waschen der vorbehandelten Zellmonolayer mit PBS werden die Zellen in eiskalter PBS abgekratzt. Zentrifugation bei 450 g für 10 min bei 4°C pelletiert die Zellen. Sie werden in 5 ml NP40-LP resuspendiert und für 10 min inkubiert. Um die Zellmembranen gut aufzuschließen, werden die lysierten Zellen 20mal in einer 10 ml Pipette aufgezogen und die Zellen anschließend wieder abzentrifugiert. Das Pellet wird in LP resuspendiert, 10mal durch eine Pipette gezogen und wieder abzentrifugiert. Schließlich wird das Pellet in 1 ml LP resuspendiert und die Kerne gezählt. Pro Ansatz werden 1-2 x 10^7 Zellkerne verwendet. Das entsprechende Volumen wird in ein 2,5 ml Eppendorfgefäß transferiert, die Kerne pelletiert und in 100 µl AP aufgenommen.

2.17.3. Transkription der RNA

Die Vorbereitung der Materialien und Lösung geschieht wie in 2.12. beschrieben. Der Reaktionsansatz wird so eingestellt, daß pro Reaktion 100 µl zur Verfügung stehen:

66,2 µl 2x RP
12 µl α^{32}P-UTP
(12 µCi/Ansatz)
21,8 µl H_2O

Das Ansetzen des Reaktionsansatzes erfolgt durch Zugabe von H_2O und 2x RP in die Radioaktivität. 100 µl dieses Reaktionsgemisches kommen auf 100 µl Kernsuspension in LP. Das ergibt ein Gesamtvolumen von 200 µl. Die Reaktionszeit dauert 25 min bei 30°C. Anschließend erfolgt ein DNase Verdau mit 10 µl RNase freier DNase I (2 mg/ml) zu jedem Ansatz. Die Reaktion läuft 5 min bei 30°C unter mehrfachem Durchmischen.

2.17.4. Präparation der RNA

2.17.4.1. Kernlyse und Proteinase K-Verdau

1 Volumen 2x SET (200 µl) und 4 µl Proteinase K (10 mg/ml) kommen zu jedem Ansatz. Die Inkubation dauert 30 min bei 42°C.

2x SET	2% SDS
	10 mM EDTA
	20 mM Tris-Cl pH 7.4

Anschließend wird 1/2 Volumen Phenol (200 µl) zugegeben, kräftig durchmischt, wieder 1/2 Volumen Phenol, durchmischt und bei 10 000 g für 2 min abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird abgenommen, die organische mit 100 µl TE pH 7.4 nachextrahiert.

2.17.4.2. DNase Verdau der RNA

Jeder Ansatz wird nach Zugabe von 3 µl (150 µg tRNA) Carrier-RNA und 1 Volumen 10%iger TCA 30 min auf Eis gefällt, auf Nitrozellulose gesaugt und mit 3%iger TCA gewaschen.

10% TCA	10% TCA (Trichloressigsäure) in 60 mM $Na_3P_8O_7$
3% TCA	3% TCA in 30 mM $Na_3P_8O_7$

Zu den Filtern, transferiert in silikonisierte 10 ml Glasgefäße, werden zu jedem Ansatz 900 µl DNase I-Puffer und 25 µl (50 µg) DNase I gegeben. Die Reaktion dauert 30 min bei 37°C.

DNase I-Puffer	20 mM Hepes pH 7.5
	5 mM $MgCl_2$
	1 mM $CaCl_2$

2.17.4.3. Elution der RNA

Zu dem DNase Verdauansatz kommen 27 µl 0.5 M EDTA und 45 µl 20% SDS; 10 min bei 65°C inkubiert. Der Überstand wird abgenommen, mit 500 µl 1x SET für 10 min bei 65°C nacheluiert und mit dem ersten Überstand vereinigt. Es erfolgt nochmals ein Proteinase K-Verdau durch Zugabe von 3,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) für 30 min bei 37°C. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wird in phenolresistenten 5 ml Röhrchen durchgeführt. Der Ansatz von 1,4 ml wird mit 1/2 Volumen Chloroform und 1/2 Volumen Phenol gut gemischt und zentrifugiert. Nach einer zweiten Chloroform-Phenol-Extraktion erfolgt eine Nachextraktion mit Chloroform.

Phenol gepuffert mit ANE: 10 mM Na-Acetat pH 6
100 mM NaCl
1 mM EDTA

Die anschließende Partialhydrolyse verläuft unter Einsatz von 28 µl 10 N NaOH (0.2 N Endkonzentration) für 10 min auf Eis. 341 µl 1 M HEPES neutralisieren den Ansatz. Das gesamte Volumen wird in Correx-Röhrchen transferiert, mit 1/10 Volumen 3.3 M Na-Acetat pH 5.5 und 2.5 Volumen absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die RNA wird bei 4°C für 15 min mit 9000 g abzentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 600 µl ddH_2O bei 70°C gelöst, ein Aliquot abgenommen, ausgezählt, und die verschiedenen Ansätze auf gleiche Countzahl eingestellt.

2.17.5. Hybridisierung

Hybridisieren, Waschen der Filter und Autoradiographie erfolgt wie bei 2.16.1. beschrieben. Der Hybridisierungsmix enthält anstelle von Heringssperma-DNA 0.5 mg/ml Hefe-RNA und als radioaktiv markierte Nukleinsäure eine RNA.

2.18. In situ Hybridisierung (Haase et al., 1984; Lawrence und Singer, 1985)

2.18.1. Vorbehandlung der Objektträger (Rentrop et al., 1986)

Zur verbesserten Haftung der Zellen auf den Objektträgern (OT) werden diese aminoalkyliert. Dazu inkubieren die OT über Nacht in 10% alkalischem Extran MA01, werden 2 h unter fließendem warmem H_2O gewaschen, mit dH_2O nachgespült und getrocknet. Anschließend werden die OT für 5 Sekunden in 2% (v/v) APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) in Aceton (p.a.) getaucht, kurz zweimal in Aceton, dann mit ddH_2O gewaschen und bei 42°C getrocknet. Das Aufbewahren der OT geschieht staubfrei. Sie sind mindestens 4 Monate ohne Qualitätseinbuße haltbar.

2.18.1.1. Silikonisieren der Deckgläschen

Die Silikonisierungslösung wird wie vom Hersteller angegeben eingesetzt.

2.18.2. Zentrifugieren und Fixieren von Zellen auf Objektträgern

2.18.2.1. Zentrifugation

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, vom Boden der Kulturschale abgelöst, gezählt und auf eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Für die in situ Hybridisierung sollten die Zellen auf den Objektträgern keine Zellhaufen bilden, sondern möglichst vereinzelt liegen. Nachdem die Zellzahl auf die gewünschte Konzentration in 100 µl eingestellt ist, erfolgt nach Applikation der Zellen die Zentrifugation für 5 min bei 400 rpm (Cytospin 2, Shandon Southern Products Ltd., Astmoor, Runcorn, Cheshire, Großbritannien). Jeder Objektträger wird hinsichtlich seiner optimalen Zelldichte begutachtet.

2.18.2.2. Fixieren der Zellen

4% Paraformaldehyd wird in heißes PBS gerührt und vollständig nach Zugabe von 2 Tropfen 1 N NaOH pro Gramm Paraformaldehyd gelöst. Die auf dem Objektträger haftenden Zellen werden 10 min in Paraformaldehyd fixiert, kurz in 70% Ethanol gewaschen und bei -20°C in 70% Ethanol aufbewahrt.

2.18.3. Vorbereitung der Zellpräparate für Hybridisierung

Die bei -20°C gelagerten Präparate rehydrieren in PBS, 5 mM $MgCl_2$ für 10 min, äquilibrieren 10 min in 0.2 M Tris, 0.1 M Glycin pH 7.4 und inkubieren anschließend für mindestens 10 min in 50% Formamid, 0.6 M NaCl, TE pH 8. Die Präparate werden trockengetupft und sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

2.18.4. RNase-Kontrollen

Als Kontrolle für die Spezifität des Hybridisierungssignals werden die Zellen auf den Objektträgern mit RNase inkubiert. Dadurch tritt nach der Hybridisierung in diesen Zellen nur noch die unspezifische Bindung der Radioaktivität auf.

Die Objektträger wässern für 1/2 bis 1 h in PBS, werden fusselfrei abgetrocknet und pro Präparat mit 30 bis 60 µl Gesamtmix inkubiert. Die Zellen werden mit einem Deckgläschen abgedeckt und der Verdau in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 bis 2 h durchgeführt. Danach werden die Präparate kurz zweimal in PBS gewaschen und wie in 2.18.3. beschrieben vorbehandelt.

RNase-Mix

20 µl RNase A (10 mg/ml)
2 µl RNase T_1 (10^5 U/ml) 1:10 verdünnt
150 µl H_2O

Gesamt-Mix
172 µl RNase-Mix
150 µl 20x SSC
1200 µl H_2O

Das ergibt eine Endkonzentration von 130 µg RNase A/ml, 13 U RNase T_1/ml und 2x SSC. 5 min auf 100°C erhitzen, um die DNase im RNase-Mix zu inaktivieren.

2.18.5. Hybridisierung

Die Nicktranslation erfolgt wie bei 2.15.1. beschrieben. Die Hauptfraktion des Säuleneluats wird auf 2 M NH_4-Acetat gebracht und mit 2,5 Volumen Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Die Aufbereitung der DNA für die Hybridisierung erfolgt durch Pelletieren bei 10 000 g,20 min, Waschen mit 70% Ethanol und Lösen des Pellets in Formamid (2 ng DNA/µl). Der Hybridisierungsmix setzt sich aus den Lösungen A und B zusammen.

Lösung A (pro Ansatz)
0.15 ng cDNA in Formamid
0.25 µg/µl Heringssperma DNA (11 min ultrabeschallt)
1 µg/µl tRNA
10 mM DTT
50% Formamid (auf A und B bezogen)

Die Lösung A wird für 10 min bei 70-80°C gekocht.

Lösung B
2x SSC
10% Dextransulfat
10 mM DTT
1,25 µg/µl BSA (nukleasefrei)
0.1 µg/µl Poly A
5 mM Pipes pH 6.8

Die Lösungen A und B werden gut durchmischt und in Portionen von 10 µl auf ein Zellpräparat aufgetragen. Das Abdecken des Hybridisierungsmix erfolgt mit einem silikonisierten Deckgläschen (möglichst blasenfrei). Die Hybridisierungskammer aus Objektträger und Deckglas wird mit Rubber-Cement abgedichtet. In einer feuchten Kammer erfolgt die Hybridisierung über Nacht bei 37-42°C. Nach der Hybridisierung werden die Deckgläschen abgenommen und die Präparate einer Waschprozedur (im Wasserbad bei 42°C, unter Schütteln) unterzogen:

1 h in 50% Formamid, 2x SSC, TE pH 7.5
2mal 45 min in 50% Formamid, 1x SSC, TE pH 7.5
2mal 30 min in 1xSSC, TE pH 7.5

Die Präparate werden durch eine aufsteigende Ethanolreihe (2mal 70%, 1mal 95% in 0.3 M NH_4-Acetat, jeweils 5 min) dehydratisiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.18.6. Autoradiographie

Die Fotoemulsion NTB2, 1:2 mit 0.6 M NH_4-Acetat verdünnt, wird auf 42°C erwärmt, die Objektträger kurz eingetaucht und leicht schräg stehend bei 18°C für mindestens 2 h getrocknet. Die Präparate kommen in lichtdichte und Trockenmittel enthaltende Kästen und werden bei 4°C exponiert. Die Expositionszeiten liegen zwischen 9 und 30 Tagen. Die Autoradiogramme werden in Kodak D19 (1:1 mit 4°C kaltem H_2O verdünnt) für 3 min bei 15°C entwickelt, kurz in H_2O getaucht und für 5 min in Ilford IL2 oder Kodak Unifix fixiert. Alle Fotochemikalien werden vor Gebrauch verdünnt und nur einmal verwendet. Die Präparate wässern nach dem Fixieren mindestens für 1/2 Stunde und trocknen dann an der Luft.

2.18.7. Färben der Präparate

Die Färbung der Zellen erfolgt mit Giemsa Färbelösung als 1:20 Verdünnung des Konzentrats. Die Zellen werden 10 bis 15 min gefärbt, 2 min mit H_2O gewaschen und die Fotoemulsion von der Rückseite der Objektträger abgerieben (Objektträger wird dadurch heller). Nach kurzem Eintauchen in Toluol werden die Objektträger mit 1 bis 3 Tropfen Eukitt eingedeckt.

2.18.8. Auswerten der Präparate

Die Zellen werden unter dem Mikroskop (Leitz, Stuttgart) bei einer 500fachen Vergrößerung ausgewertet. Auf jedem Präparat werden die Anzahl der Silberkörner, als Maß für die Hybridisierung, von mindestens 100 intakten Zellen ausgezählt. Als Kontrolle dienen die jeweils mit RNase verdauten und hybridisierten Präparate.

2.19. Umklonieren von DNA

Nicht die Frage, welche cDNA umkloniert werden soll, sondern die nach dem geeigneten Vektor ist wichtiger. Durch Umklonieren der cDNA in geeignete Vehikel kann eine bessere Anpassung an die Problemstellung erreicht werden.

2.19.1. Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdaus erfolgen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers.

2.19.2. Dephosphorylieren der Plasmidvektoren

Plasmid-DNA (10-30 µg) wird vollständig verdaut, die Reaktion mit 10 mM EDTA abgebrochen, das Restriktionsenzym durch Erhitzen auf 65°C oder Extraktion mit Phenol/Chloroform (Maniatis et al., 1982, S. 458ff) inaktiviert bzw. entfernt und die DNA mit 2 Volumen Ethanol gefällt.

Das getrocknete Pellet wird in 45 µl TE pH 8 gelöst und mit 5 µl 10x Cip-Puffer versetzt.

10x Cip-Puffer	500 mM Tris-Cl pH 9
	10 mM $MgCl_2$
	1 mM $ZnCl_2$
	10 mM Spermidin

Um die Effizienz der Dephosphorylierung zu erhöhen, verläuft die Reaktion über 3 Stufen, wobei jedesmal frisches Enzym in den Ansatz kommt.

Reaktionssequenz	45 µl DNA in TE
	5 µl 10x Cip-Puffer
	1 µl (20 U) alkalische Phosphatase
	15 min bei 37°C inkubieren
	1 µl (20 U) alkalische Phosphatase
	15 min bei 37°C inkubieren
	1 µl (20 U) alkalische Phosphatase
	30 min bei 37°C inkubieren

Der Reaktionsabbruch erfolgt durch Zugabe von

	40 µl H_2O
	10 µl 10x TNE
	25 µl 20x SDS

10x TNE	0.1 M Tris-Cl pH 8
	1 M NaCl
	0.01 M EDTA

Anschließendes Erhitzen auf 68°C für 15 min inaktiviert das Enzym (Maniatis et al., 1982, S. 458). Nach Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion pelletiert die DNA nach Zugabe von 2 Volumen Ethanol. Das Pellet wird in einer

Konzentration von 50 ng/µl in TE pH 8 gelöst. Die Vektor DNA (M13, Bluescribe-M13) wird mit 2 Volumen Ethanol gefällt, in einer Konzentration von 50 µg/ml in TE gelöst und bei -70°C aufbewahrt. Der Vektor wird in einer Testtransformation mit und ohne Religation durch T4 DNA-Ligase getestet. Es sollte in beiden Fällen zu weniger als 0.2×10^{-11} Transformanten/µMol Vektor führen (1% des geschnittenen Kontrollvektors).

2.19.3. Ligation (King und Blakesley, 1986)

Zur Ligation von Fremd-DNA mit bakteriellen Vektoren wird ein optimiertes Protokoll von King und Blaksesley verwendet. Durch den Zusatz von Polyethylenglykoll zum Ligationspuffer soll sich dieses Protokoll zur Ligation von überstehenden kompatiblen und zur Ligation von stumpfen Enden eignen.

5x PEG-Ligationspuffer	250 mM Tris-Cl pH 7.6
	50 mM $MgCl_2$
	25% Polyethylenglykoll 8000
	5 mM ATP
	5 mM Dithiothreitol
	in Aliquots bei -20°C lagern
Reaktionsansatz	100 ng Vektor DNA
	200 ng Fremd-DNA Fragment
	4 µl 5x PEG-Ligationspuffer
ad	20 µl H_2O
	1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl)

Die Reaktion wird für 4 h bei 26°C inkubiert. Die Kontrollansätze der Ligation bestehen aus einem Ansatz mit restringiertem Vektor und einem Ansatz mit restringiertem dephosphoryliertem Vektor.

Der Ligationsansatz wird bei 4°C aufbewahrt. 2 µl davon werden mit 8 µl TE pH 8 verdünnt und 4 µl der Verdünnung (10 ng Vektor-DNA und 20 ng Fremd-DNA) zur Transformation kompetenter Zellen eingesetzt.

2.19.4. Transformation von E. coli mit Plasmid DNA (Hanahan, 1985)

Es wird die "standard high efficiency" Prozedur nach Hanahan verwendet. Sie gibt eine hohe Transformationseffizienz sowohl mit großen als auch relaxierten Plasmiden und führt zu einem hohen Anteil kompetenter Zellen für die Transformation. Die Prozedur bietet sich an, wenn nur eine geringe Anzahl rekombinanter Plasmidmoleküle erwartet wird.

Die Durchführung entspricht der von Hanahan beschriebenen Methode. Als Wirtsbakterien werden JM101 ($recA^+$) und JM109 ($recA^-$) verwendet. Bei den eingesetzten Chemikalien sollte auf größtmögliche Reinheit geachtet werden (culture pure). Wasser wird nach Quarzdestillation direkt eingesetzt. Zellen mit Bluescribe $M13^+$ transformiert, werden auf X-Gal-Agar ausplattiert.

X-Gal-Agar — Agar in LB (Maniatis et al., 1982, S. 440)
100 µg/ml Ampicillin
2 mM IPTG
40 µg/ml X-Gal (w/v in Dimethylformamid)

Durch die X-Gal (5-bromo-4-chloro-3 indoyl D-Galaktosid)-IPTG (Isopropyl beta-D-thigalactopyranosid) Reaktion kommt es bei intaktem Lac-Z-Gen in der Vektor-DNA (also keine Fremd-DNA in der "multiple-cloning-site") zur Blaufärbung der Kolonie. Die Kolonien läßt man 12 bis 18 h bei 37°C wachsen. Zur Verstärkung der Blaufärbung inkubiert man die Zellen für 2 h bei 4°C. Das Ausplattieren von Bluescribe $M13^+$ transformierten Zellen erfolgt exakt wie im Biolabs Laboratory Manual (New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Taunus) beschrieben.

2.19.5. Verifizierung umklonierter DNA

Die Kolonien werden mit Zahnstochern gepickt und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgt die DNA-Präparation analog der "Alkaline Lysis Method" wie bei Maniatis et al. (1982, S. 368f) beschrieben. Nach Restriktionsverdau (2.19.1.) wird die DNA über native Agarosegele (2.13.1.1.) verifiziert.

Die Zellen mit der Fremd-DNA werden als Glycerinkultur (Maniatis et al., 1982, S. 62) bei -70°C aufbewahrt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen

Knochenmarkszellen differenzieren in konditioniertem Medium in sieben bis zehn Tagen zu Makrophagen. Diese Entwicklung wurde anhand verschiedener Parameter verfolgt. Die Monolayer, wie auch die Zellen des Überstands, wurden über sieben Tage täglich gezählt, eine bestimmte Zellzahl zur Interferoninduktion ausgesät und schließlich adhärente Zellen wie nicht adhärente Zellen auf Objektträger zentrifugiert. Die auf Objektträger zentrifugierten Zellen wurden der unspezifischen Esterasefärbung unterzogen. Mit Hilfe einer Gegenfärbung, wie Methylgrün, konnten auch die nicht esterasepositiven Zellen erfaßt werden. Die Auswertung der Esterasefärbung erfolgte im Mikroskop, bei der statistisch eine bestimmte Anzahl an Zellen ausgezählt und in esterasepositive und -negative Zellen unterschieden wurde. Ziel dieser Untersuchung war zu zeigen,wie sich diese Population über die Zeit entwickelt und wie homogen sie am Endpunkt der Differenzierung ist. Als weiterer Parameter neben der Färbung wurde Interferoninduktion mit 10-Carboxymethyl-9-acridanon (CMA) herangezogen.

Die Zellen wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen präpariert, aufgearbeitet und in 9 cm Petrischalen ausgesät. Täglich wurden die Zellen gezählt und zwischen 3 und 5 x 10^5 Zellen pro ml des Überstands und der adhärenten Zellen auf Objektträger zentrifugiert. Dann wurden die Zellen fixiert oder luftgetrocknet. An jedem Tag wurden die ahdärenten Zellen in einer Zellzahl von 1,85 x 10^6 in 5 ml Medium (RPMI 1640, 2,5% FBS) in beschichteten Kulturschalen eingesetzt. 24 h später erfolgte die Induktion mit 500 µg/ml CMA für weitere 24 h. Die Überstände wurden auf Interferon im biologischen Test austitriert. Die Zellzahlen des Überstands als auch die des Monolayers schwankten über die Zeit der Kultivierung. Am Tag eins waren 3 x 10^6 Zellen im Überstand, am Tag zwei nur noch knapp 1 x 10^6. Danach erfolgte ein stetiger Anstieg der Zellzahl, bis am Tag sechs 4,4 x 10^6 Zellen gezählt werden konnten. Am Tag sieben reduzierte sich die Zellzahl auf 2,6 x 10^6 Zellen. Der Anstieg der Zellzahl am Tag sechs beruhte wahrscheinlich auf dem Austausch des Mediums am Tag fünf.

Tab. 1: Zellzahl von Makrophagenkulturen in Abhängigkeit von der Zeit

Tag		1	2	3	4	5	6	7
Gesamtzellzahl x 10^6	Überstand	3.52	0.98	1.76	2.0	2.16	4.4	2.65
	Monolayer	1.85	0.45	1.05	5.0	6.48	4.2	7.68

Die nach Esterase-Färbung positiven Zellen des Monolayers nahmen kontinuierlich zu, bis sie nach sechs Tagen ein Maximum von 98% hatten. Im Überstand waren in den ersten fünf Tagen zwischen 10 und 25% esterasepositive Zellen vorhanden. Die parallel angesetzte Induktion von Interferon ergab bis Tag drei einen Titer um fünf Einheiten pro ml. Nach Tag drei stiegen die Interferontiter rapide an und erreichten am Tag sieben einen Titer von über 900 Einheiten. Innerhalb eines Tages versechsfachte sich also der Interferontiter.

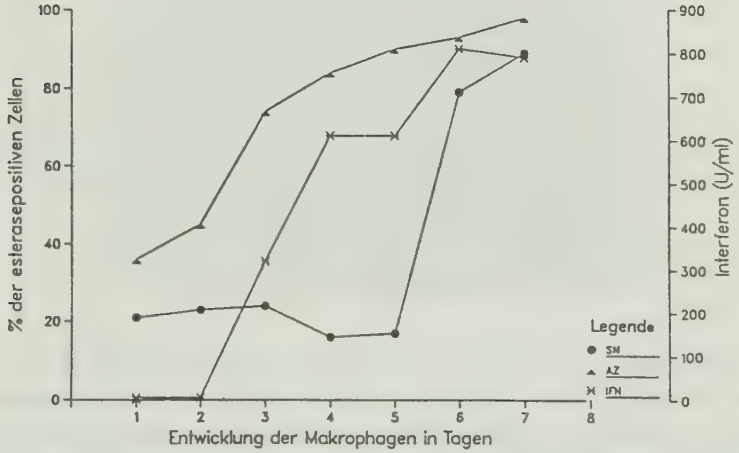


Abb. 1: Esterasepositive Zellen des Überstands (SN ●) und adhärenter Zellen (AZ ▲) von Makrophagenkulturen im Vergleich mit Interferoninduktion mit CMA/IFN(*)

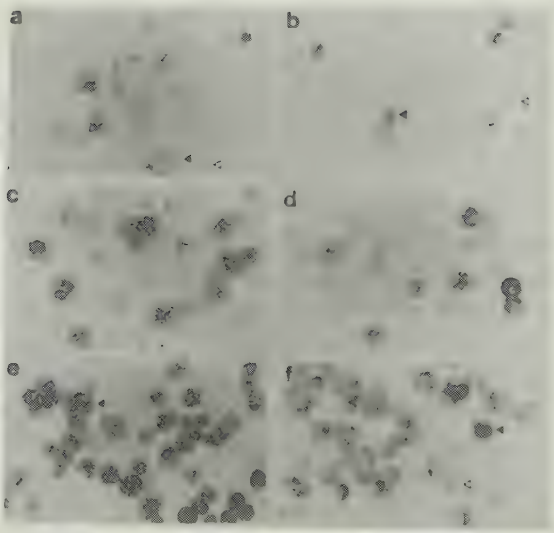


Abb. 2: Esterasefärbung der Knochenmarksmakrophagen, a, c, e, adhärente Zellen b, d, f,: Zellen des Kulturüberstands, a,b: Tag eins, c,d: Tag 4 und e,f: Tag sieben;◅: esterasepositive Zellen,◅: esterasenegative Zellen

3.2. Erzeugung von Mensch-Maus-Hybriden durch Fusion von Knochenmarksmakrophagen mit BUD-8-Zellen und Interferoninduktion mit CMA

Knochenmarksmakrophagen der Maus erzeugten auf CMA-Induktion hohe Titer an Interferon. In BUD-8 Zellen konnte nach Induktion mit CMA kein menschliches Interferon nachgewiesen werden. Dies war nicht zelltypspezifisch, sondern konnte auch mit anderen Zellinien gezeigt werden, wie z.B. mit Primärkulturen aus menschlichen Vorhautfibroblasten.

Durch Fusion der Maus- und Menschzellen und der Erzeugung von Heterokaryonten sollte versucht werden, ob nach Induktion mit CMA menschliches Interferon erzeugt werden kann. Um eine möglichst hohe Fusionsrate zu erhalten, wurden verschiedene Fusionsbedingungen ausgetestet. Außerdem wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Fusion (24 h und 48 h später) die Zellen induziert und 24 h später die Überstände auf Mensch- und Mausinterferon ausgetestet. Als Induktoren wurden CMA und Sendai Virus eingesetzt. Als Kontrollen fungierten nicht induzierte, fusionierte wie nichtfusionierte Zellen.

Tab. 2: Versuchsaufbau einer Fusion

Zeit	t1 = 24 h		t2 = 48 h
Induktion	keine	CMA	Sendai Virus
Fusionsbedingungen	nicht fusioniert		
	45% PEG/10% DMSO (Fusionsmedium I)		
	50% PEG (Fusionsmedium II)		

Die mikroskopische Auswertung der Fusion ergab, daß bei Makrophagen, behandelt mit Fusionsmedium I (45% PEG, 10% DMSO), nach 24 h große Areale mit Zellen zu sehen waren, die zwei und mehr Kerne enthielten. Nach 48 h konnten keine offensichtlichen Multikaryonten entdeckt werden, jedoch waren die Zellkerne zum Teil sehr groß und zeigten vereinzelt ungewöhnliche Chromatinverteilung, die jedoch bei fusionierten Zellen nach 24 h ausgeprägter war. Die Behandlung mit Fusionsmedium II (50% PEG) erbrachte keine Fusionate. Viele tote Zellen in weiten Arealen traten nach beiden Zeitpunkten auf, wie es für PEG-Fusions-

ansätze typisch scheint. Bei autologer Fusion (Fusion von Zellen des gleichen Typs und Spezies) von BUD-8 Zellen lagen 24 h nach Behandlung mit Fusionsmedium I selten mehrkernige Zellen vor. Bei Behandlung mit Fusionsmedium II waren die meisten Zellen tot. Bei den gemischten Ansätzen waren, obwohl theoretisch etwa 25% BUD-8 Zellen vorliegen sollten, nur etwa 5% vorhanden. Daher waren sehr wenig Kerne menschlicher Zellen zu beobachten. Die Behandlung mit Fusionsmedium II führte offensichtlich zum Tod der meisten Zellen, weder nach 24 noch 48 h waren Fusionate zu entdecken. Wurde Fusionsmedium I eingesetzt, konnten Heterokaryonten beobachtet werden. Die geringe Anzahl der fusionierten Zellen ließe sich auf die geringe Anzahl menschlicher Zellen in den gemischten Ansätzen zurückführen. Wie bei der autologen Fusion von Makrophagen nach Behandlung mit Fusionsmedium I waren auch bei der Fusion von Mischkulturen (heterologe Fusion) nach Behandlung mit Medium I Aggregate mit außergewöhnlicher Chromatinverteilung auffallend.

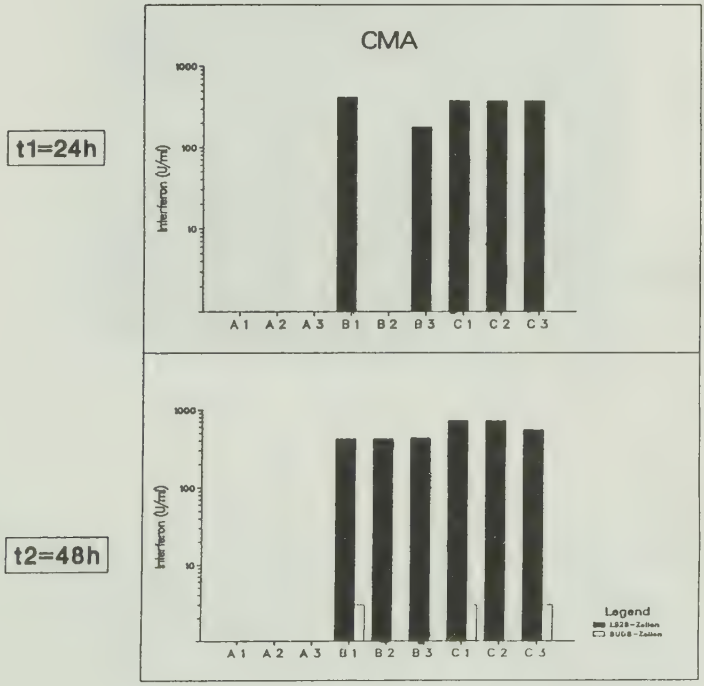
Der Nachweis von Interferon in den Zellüberständen ergab folgendes Bild: Nichtinduzierte Monolayer, ungeachtet ob fusioniert oder nicht, zeigten keinerlei Interferonaktivitäten. Bei der Induktion mit Sendai Virus konnte in Gegenwart von BUD-8 Zellen menschliches Interferon mit einem Titer von etwa 50 Einheiten/ml nachgewiesen werden. Bei der Titration auf Mauszellen konnte in nicht fusionierten Makrophagen nach Sendai Virus-Induktion über 700 Einheiten pro ml nachgewiesen werden. Auch fusionierte Makrophagenkulturen erzeugten etwa 100 Einheiten pro ml. Bei gemischten Ansätzen lagen die Interferontiter etwas niedriger, bei nicht fusionierten Zellkulturen zwischen 400 und 600 Einheiten/ml und bei fusionierten Zellkulturen in der gleichen Größenordnung wie bei fusionierten Makrophagen.

Nach CMA-Induktion von Makrophagenkulturen konnten bei der Titration auf Mausinterferon etwa 400-500 Einheiten/ml nachgewiesen werden. In Mischkulturen wurde Interferon in etwa der gleichen Größenordnung nachgewiesen, wobei in Fusionsansätzen mit Medium II weniger Interferon induziert werden konnte. Bei der Titration auf menschliches Interferon konnten nach CMA-Induktion nichtfusionierter Makrophagen, nichtfusionierter Makrophagen-BUD-8 Mischkulturen und bei mit Medium I behandelten Mischkulturen nur sehr geringe Interferontiter (etwa 3 Einheiten pro ml) nachgewiesen werden. Auffallenderweise traten diese Interferonaktivitäten erst nach 48 h auf. Nach dem ersten Zeitpunkt waren keinerlei Interferonaktivitäten zu beobachten.

Die Behandlung mit Fusionsmedium I führte zu einer höheren Überlebensrate und zu einer größeren Anzahl an Fusionaten als mit Fusionsmedium II. Die Interferoninduktion führte 48 h nach der Fusion zu höheren Titern als nach 24 h.

Abb. 3: Titration der Interferonaktivitäten nach Induktion der Zellkulturen zu t1 und t2 nach Fusion; A: BUD-8 Zellen, B: Makrophagen, C: BUD-8-Makrophagen Mischkultur, 1: nichtfusionierte Zellen, 2: Fusionsmedium I, 3: Fusionsmedium II

Abb. 3a: Induktion mit CMA



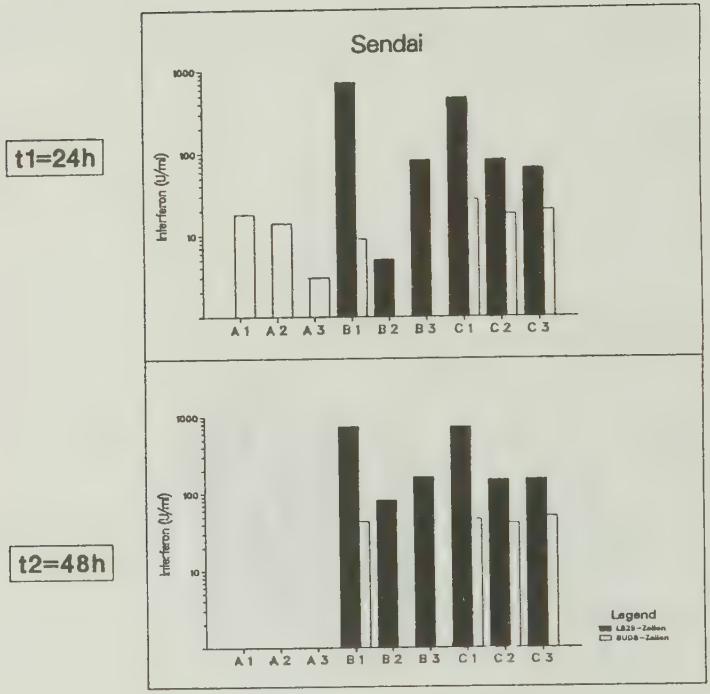


Abb. 3b: Induktion mit Sendai-Virus

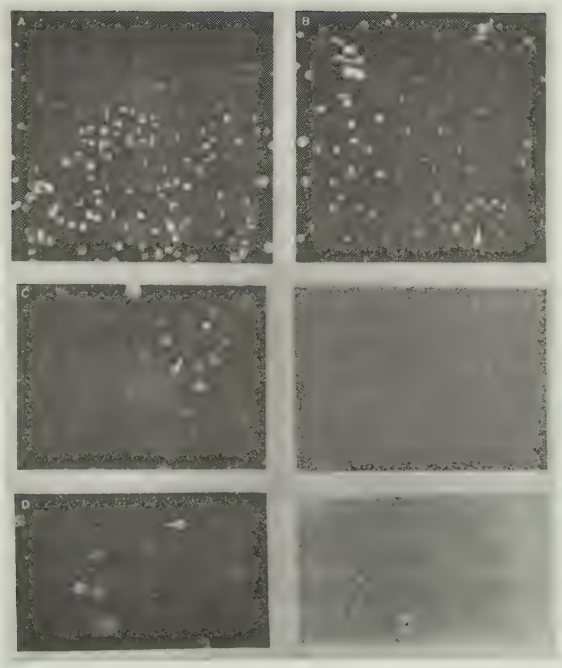


Abb. 4: Fusion von Makrophagen mit BUD-8 Zellen; A: Übersicht nichtfusionierter Zellen, B: fusionierter Zellen (Fusionsmedium I), C,D: Heterokaryons (nach Färbung mit Hoechstfarbstoff 33258), C'D': Heterokaryons (Phasenkontrastaufnahme);◄: menschliche Zellen

3.3. Charakterisierung in vitro und in vivo induzierter Interferone

Die induzierten Interferone wurden über Gradientenpolyacrylamidgele aufgetrennt. Aus den in Streifen geschnittenen Gelspuren wurde das Interferon eluiert und im biologischen Test ausgewertet. Die Molekulargewichtsbereiche ließen sich über parallel mitgelaufene Markerproteine, mit denen eine Eichkurve erstellt wurde, ermitteln.

Tab. 3: Markerproteine (Sigma DVI)

Protein	Molekulargewicht (d)
Lysozym	14 300
ß-Lactoglobulin	18 400
Trypsinogen	24 000
Pepsin	34 700
Ovalbumin	45 000
Rinderserumalbumin	65 000

Die Zuordnung der Aktivitäten zu den Interferonsubtypen erfolgte schließlich durch Neutralisation mit Antikörpern gegen Interferon-α und -ß. Vor der Auftrennung über Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mußten die in vitro erzeugten Interferone über Ultrafiltration konzentriert werden, um die durch die Aufarbeitung entstehenden Verluste an Aktivitäten auszugleichen. Die aus den Gelstreifen eluierten Interferonaktivitäten wurden summiert und als 100% definiert. Die Interferonaktivitäten, die einem Molekulargewichtsbereich zugeordnet werden konnten, wurden als Teil der insgesamt eluierten Interferonmenge in Prozent ausgedrückt. Als Induktoren wurden 10-Carboxymethyl-9-acridanon (CMA), Newcastle Disease Virus (NDV) und Polyinosyl-polycytidylsäure (PIC) eingesetzt. Die Konzentration der Induktoren und der Modus der in vitro-Induktion entsprachen den bei 3.3.3. beschriebenen. Bei der in vivo-Induktion wurde NDV (0,2 ml mit einem Hämagglutinationstiter von 2^{10}) intravenös appliziert. Die Induktion mit CMA (500 mg/kg) und PIC (5 mg/kg) erfolgte intraperitoneal. Das in vivo-induzierte Interferon wurde im Serum gemessen.

3.3.1. In vitro induzierte Interferone

Knochenmarksmakrophagen wurden mit CMA, NDV und PIC induziert und die 5-10fach konzentrierten Kulturüberstände über PAGE aufgetrennt. CMA- und NDV-induziertes Interferon wurde von 4000 Einheiten auf etwa 32 000 Einheiten pro ml und PIC-induziertes Interferon von 6000 Einheiten auf etwa 30 000 Einheiten pro ml konzentriert. Die Verluste im Verlauf der Interferonaufarbeitung bis zur Titration im Bioassay lagen bei durchschnittlich 70%. 50 µl der Ansätze wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.3.1.1. Molekulargewichtsbereich und Antigenität der in vitro induzierten Interferone

3.3.1.1.1. CMA-induzierte Interferone

Nach der PAGE waren CMA-induzierte Interferone in zwei Molekulargewichtsbereiche aufgetrennt. Der Kleinere lag etwa bei 30 000 d und der Größere bei 39 000 d. Sie standen in einem prozentualen Verhältnis von 75 zu 25%. Durch Neutralisation mit Antikörpern gegen Interferon-ß konnten beide Aktivitäten inaktiviert werden. CMA induziertes Interferon bestand also zu 100% aus Interferon-ß. Bei der Molekulargewichtsbestimmung von über drei Säulen teilgereinigtem Interferon verschoben sich die zwei Molekulargewichtsbereiche, wahrscheinlich bedingt durch die Präparationsprozedur, auf 24 000 bis 27 000 d und auf 32 000 bis 34 000 d. Sie waren beide durch Antikörper gegen Interferon-ß neutralisierbar.

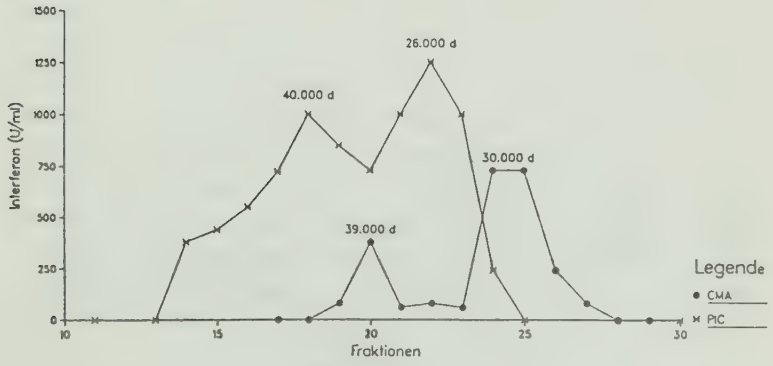


Abb. 5: Elutionsdiagramm CMA- und PIC-induzierter Makrophageninterferone

3.3.1.1.2. PIC-induzierte Interferone

Nach Auftrennung über die PAGE konnten zwei Aktivitätsspitzen nachgewiesen werden. Die Kleinere lag bei 26 000 d und die Größere bei 40 000 d, eine ähnliche Situation wie bei CMA-induzierten Interferonen. Die Neutralisation führte zur Zuordnung der beiden Aktivitäten zum Interferon-ß Typ. Wie CMA induzierte auch PIC in Makrophagen 100% Interferon-ß. 75% aller eluierten Aktivitäten konnten dem kleineren Molekulargewichtsbereich und 25% dem größeren zugeordnet werden.

3.3.1.1.3. NDV-induziertes Interferon

Dieses Interferon führte nach Trennung über PAGE zu Aktivitätsspitzen in drei Molekulargewichtsbereichen, wobei die dritte einen verschwindend kleinen Anteil von nur drei bis sieben Prozent ausmachte. Er hatte ein Molekulargewicht von etwa 17 000 d bis 18 000 d. Der Nächstgrößere hatte ein Molekulargewicht von 24 000 d und der Größte um die 32 000 d, der 75% der eluierten Interferonaktivitäten enthielt. Die 3 bis 7% des kleinen Bereiches konnten durch Antikörper gegen Interferon-α und die restlichen 93 bis 97% mit Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisiert werden.

Im Gegensatz zu den zwei anderen Induktoren induzierte NDV in Makrophagen auch Interferon vom Subtyp α, neben mehr als 90 Prozent Interferon-ß.

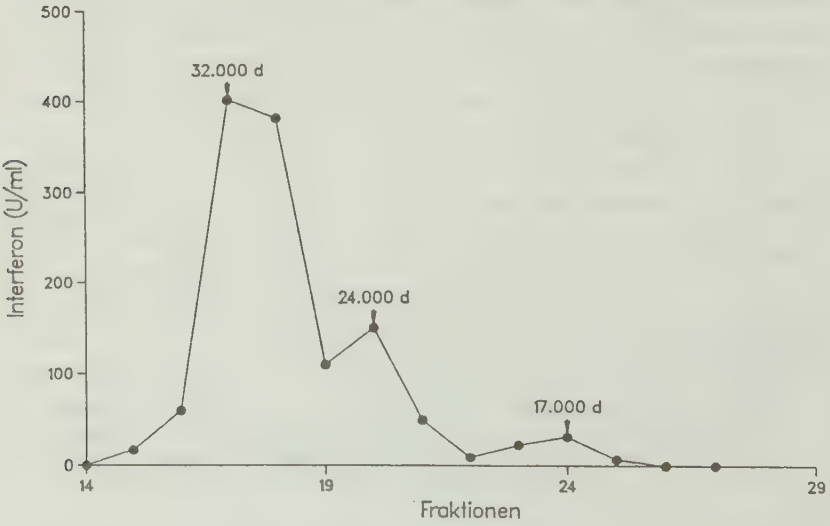


Abb. 6: Elutionsdiagramm NDV-induzierter Makrophageninterferone

3.3.2. In vivo induzierte Interferone

In C57BL/6-Mäusen wurde durch intraperitoneale oder intravenöse Applikation Interferon induziert. Als Induktoren wurden CMA, NDV und PIC eingesetzt. Nach 4 bis 5 h wurden Mäuse, induziert mit CMA und PIC, entblutet und das Serum abgetrennt. Bei Mäusen, induziert mit NDV, wurde das Serum nach 3 und 8 h gewonnen. Die Seren wurden auf etwa 40 000 Einheiten pro ml Interferon konzentriert und 30 bis 50 µl zur PAGE eingesetzt. Die Verlustrate an Aktivität entsprach den in vitro Ansätzen.

3.3.2.1. Molekulargewichtsbereich und Antigenität in vivo induzierter Interferone

3.3.2.1.1. CMA-induzierte Interferone

Nach Auftrennung des Interferons über PAGE traten Aktivitätsspitzen in zwei Molekulargewichtsbereichen auf. Der Kleinere lag im Bereich von 25-26 000 d und enthielt etwa 40% des eluierten Interferons. Der Größere konnte im Bereich von 38 000 bis 39 000 d nachgewiesen werden und enthielt die restlichen 60% der eluierten Interferonaktivitäten. Antikörper gegen Interferon-ß konnten die Aktivitäten beider Molekulargewichtsbereiche neutralisieren. Wie in vitro als auch in vivo durch CMA induziertes Interferon gehörte zu 100% zum Subtyp ß.

3.3.2.1.2. PIC-induzierte Interferone

Die PIC-induzierten Interferone wurden über PAGE in zwei Molekulargewichtsbereiche aufgetrennt. Einer befand sich im Bereich von 19 000 d, der 80% der Interferonaktivität beinhaltete. Der Zweite lag bei 27 000 d mit dem Rest der Interferonaktivität. Aktivitäten aus dem 19 000 d-Bereich konnten mit Antikörpern gegen Interferon-α und die Aktivitäten aus dem 27 000 d-Bereich mit Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisiert werden. PIC-induziertes Serum Interferon bestand somit aus 80% IFN-α und zu 20% aus IFN-ß.

Wurde hingegen das Serum erst 8 h nach PIC-Induktion gewonnen, so war nur noch Aktivität im Molekularbewichtsbereich von 19 000 d nachweisbar. Diese Aktivitäten konnten mit Antikörper gegen Interferon-α neutralisiert werden. Die 8-h-Präparation bestand also nur noch aus α-Interferon.

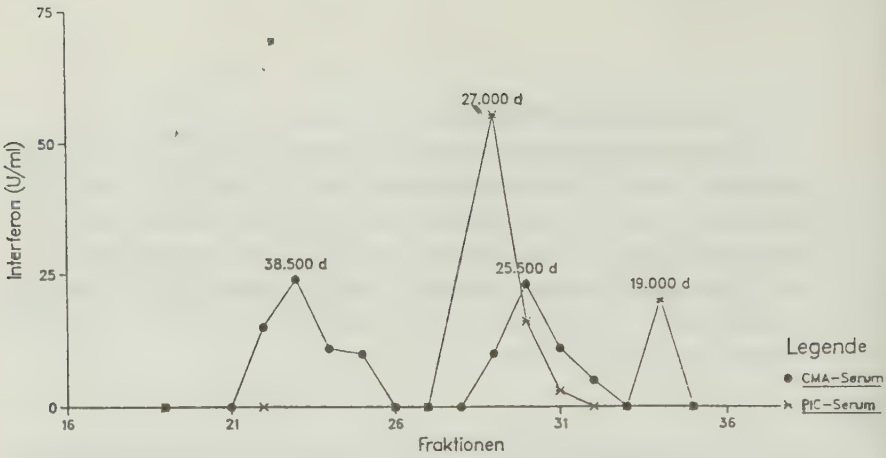


Abb. 7: Elutionsdiagramm CMA- und PIC-induzierter Seruminterferone

3.3.2.1.3. NDV-induzierte Interferone

Bei der Induktion von NDV-induziertem Interferon wurde das Serum nach 3 und 8 h gewonnen. Während dieser zwei Zeitpunkte traten im Serum hohe Titer an Interferon auf. In der dazwischen liegenden Zeit und nach 8 h wurden geringere Interferontiter nachgewiesen. 3 h nach Induktion wurden etwa 40 000 Einheiten/ml im Serum nachgewiesen. 24 h nach Induktion fielen die Aktivitäten auf 1800 Einheiten/ml.

3 h nach Induktion hatte das Interferon ein Molekulargewicht von 18 000 d und 26 000 bis 30 000 d. Die 18 000 d-Fraktion konnte mit Antikörpern gegen Interferon-α neutralisiert werden und enthielt etwa 50% des eluierten Interferons. Die 26 000 bis 30 000 d-Fraktion wurde mit Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisiert. Das 3 h nach Induktion gewonnene Serum bestand je zur Hälfte aus Interferon-α und Interferon-ß. Das 8 h nach Induktion im Serum nachgewiesene Interferon hatte ein Molekulargewicht für den niedrigsten Bereich von 19 000 d, für den mittleren Bereich von 26 000-27 000 d und für größten Bereich von 38 000 d. 70 bis 80% der Gesamtaktivität enthielt die Aktivität der 19 000 d Molekulargewichtsbereich. Die restlichen 20-30% verteilten sich so auf die anderen zwei Bereiche, daß davon 75% auf den mittleren Molekulargewichtsbereich entfielen. Antikörper gegen IFN-α neutralisierten die Aktivität des kleinsten Molekulargewichtsbereichs. Antikörper gegen Interferon-ß konnten die zwei anderen Bereiche neutralisieren. Serum 8 h nach Induktion enthielt zu drei Viertel Interferon-ß, das sich auf zwei Molekulargewichtsbereiche verteilte.

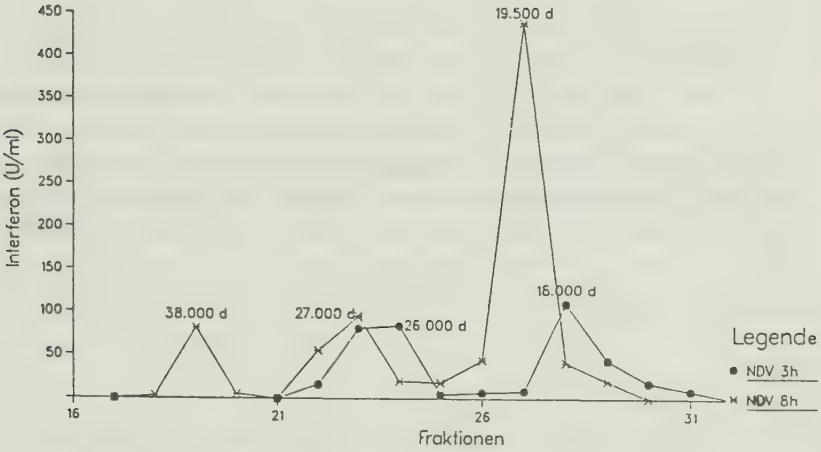


Abb. 8: Elutionsdiagramm NDV-induzierter Seruminterferone

Tab. 4: Korrelation zwischen Interferon Subtyp und Molekulargewicht CMA-, NDV- und PIC-induzierter Interferone in vitro und in vivo

Induktor und Quelle des Interferons	Verteilung der eluierten Interferonaktivitäten in %	Interferon-Subtyp	Molekulargewicht (d)
CMA (Makrophagen)	25	β	30 000
	75	β	39 000
PIC (Makrophagen)	75	β	26 000
	25	β	40 000
NDV (Makrophagen)	7	α	18 000
	19	β	25 000
	74	β	32 000
CMA (Serum)	40	β	25 500
	60	β	38 500
PIC (Serum nach 4 h)	80	α	19 000
	20	β	27 000
PIC (Serum nach 8 h)	100	α	19 000
NDV (Serum nach 3 h)	50	α	18 000
	50	β	26 000
NDV (Serum nach 8 h)	80	α	19 000
	5	β	27 000
	15	β	38 000

3.3.3. Glykosylierung induzierter Interferone

Die Interferone der Maus sind alle glykosyliert. Die posttranslationelle Glykosylierung läßt sich durch Zugabe des Antibiotikums Tunicamycin unterbinden. Tunicamycin (0.2 µg/ml) wurde gleichzeitig mit dem Induktor in den Kulturansatz gegeben. Nach sieben Stunden wurde der Überstand abgenommen, konzentriert und die PAGE durchgeführt. Gleichzeitige Zugabe von Tunicamycin und CMA in den Kulturansatz ergab eine einzige Aktivitätsspitze im Bereich von 19 000 d.

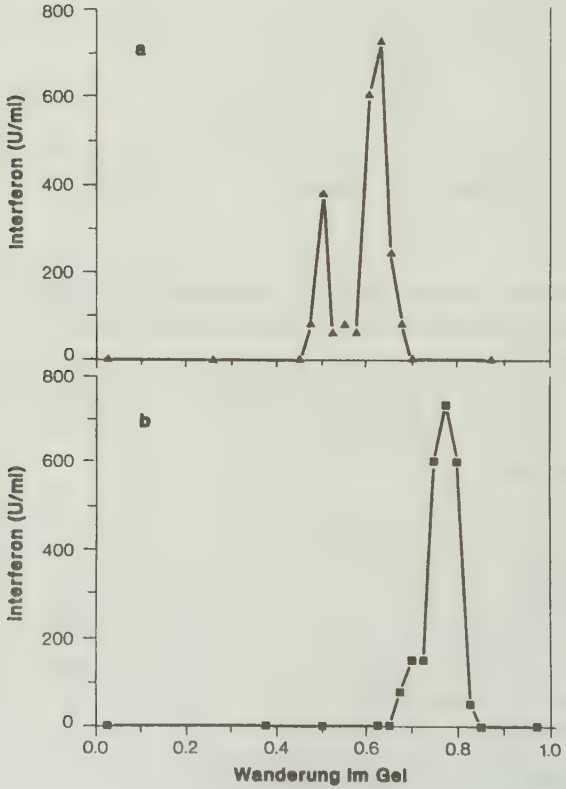


Abb. 9: Effekt der Tunicamycinbehandlung auf die Mobilität der CMA-induzierten Interferone; a ohne Tunicamycinbehandlung, b nach Tunicamycinbehandlung

Unbehandelte Makrophagenkulturen bildeten nach Induktion von CMA zwei Aktivitätsspitzen von 30 000 d und 40 000 d. Durch Tunicamycinbehandlung verschwanden die beiden Aktivitäten und es trat ein neues Aktivitätsmaximum bei 19 000 d auf.

Die Tunicamycinzugabe zu mit PIC-induzierten Makrophagen führt dazu, daß im Gegensatz zu den zwei Molekulargewichtsbereichen bei 25 000 d und 40 000 d nur noch eine Aktivität im Bereich von 25 000 d nachgewiesen werden konnte. Hier konnte keine vollständige Deglykosylierung erreicht werden.

Die Tunicamycinbehandlung bewies eindeutig, daß die CMA und PIC-induzierten Interferone stark glykosyliert waren, und die antivirale Aktivität des Interferons auch bei verringerter Glykosylierung unbeeinträchtigt blieb.

3.4. Auftrennung von Interferonpräparationen über CH-Sepharose 4B und deren Charakterisierung

Hydrophobe Eigenschaften von Proteinen bewirken Wechselwirkungen mit hydrophoben Matrices. Spezifische Elutionsbedingungen erlauben die Trennung von Proteinen aufgrund dieser Eigenschaft. Auch Glykoproteine mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden lassen sich unter Anwendung der hydrophoben Affinitätschromatographie trennen. Diese Möglichkeit der Proteintrennung ließ sich für induzierte Interferone der Maus anwenden, da beide Subtypen Glykoproteine sind und hydrophobe Eigenschaften haben.

3.4.1. pH-Wert und Leitfähigkeit als Elutionsparameter der CH-Sepharose 4B Säule

Als Waschpuffer der CH-Sepharose 4B-Säule wurde 0,02 M Natrium-Acetat, pH 5,0, eingestzt. Mit 10 ml dieses Puffers wurde ein Standardlauf von 40 Fraktionen à 2,3 ml gestartet. Das erste Elutionskriterium wurde durch Erhöhung des pH-Werts eingeleitet. Der Puffer bestand aus 0,02 M Natrium-Phosphat, pH 7,4. Davon wurden 25 ml auf die Säule gepumpt. Zwischen den Fraktionen 11 bis 15 erfolgte der Anstieg des pH-Werts. Durch Zugabe von 25 ml 0,02 M Natrium-Phosphat pH 7,4 mit 0,5 M NaCl erfolgte die Erhöhung der Ionenstärke, gemessen als Leitfähigkeit in mS, zwischen den Fraktionen 22 und 25. Sie bildete ein zweites Elutionskriterium. Anschließend wurde die Säule mit 32 ml 0,02 M Natrium-Acetat gewaschen und dadurch zwischen den Fraktionen 35 und 40 die Ausgangsbedingungen wieder erreicht.

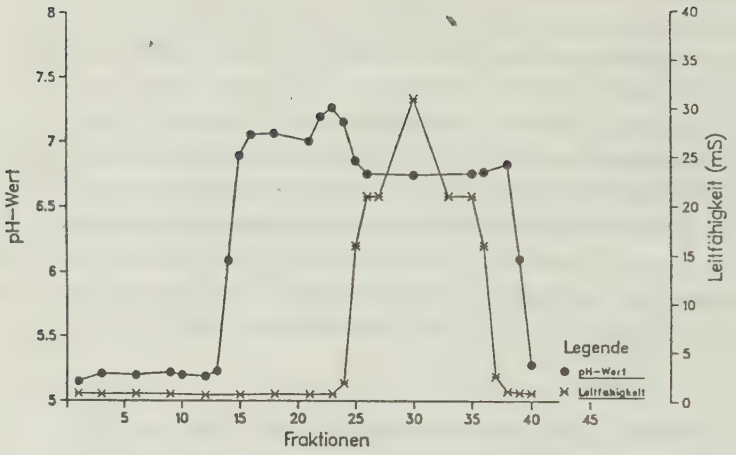


Abb. 10: Elutionsprofil eines Standardlaufes der CH-Sepharose 4B-Säule

3.4.2. Interferonaktivitäten in vitro und in vivo nach CMA-Induktion

Zu in vivo Induktionen wurden C57/BL6-Mäuse mit CMA intraperitoneal mit 500 mg/kg induziert. Die in vitro Induktion erfolgte mit 500 µg/ml CMA in Medium (RPMI 1640 mit 2,5% FBS) von sieben bis zehn Tage alten Knochenmarksmakrophagen.

3.4.2.1. In vitro Induktion von Interferon mit CMA

Makrophagen wurden induziert und die Kulturüberstände über eine CH-Sepharose 4B-Säule aufgetrennt, wobei zwei Aktivitätsspitzen auftraten. Die erste eluierte nach Anstieg des pH-Werts zwischen den Fraktionen 10 bis 13 (Akt. 2) und erstreckte sich bis in den Bereich der erhöhten Ionenstärke. Dort eluierte dann die zweite Aktivitätspitze (Akt. 1) innerhalb der Fraktionen 34 bis 37.

3.4.2.2. Neutralisation der Aktivitäten mit Antikörper gegen Interferon-ß

Die Antikörper gegen Interferon-ß wurden von 1:100 bis 1:2000 verdünnt. Zur Kontrolle der neutralisierenden Aktivität wurde gleiche Mengen an Interferon-α und Interferon-ß eingesetzt. Verdünnungen der Aktivitäten des Kulturüberstands (ca. 5000 Einheiten pro ml) und des Kontrollinterferon-ß wurden vollständig neutralisiert. Die Interferon-α Aktivität blieb erhalten.

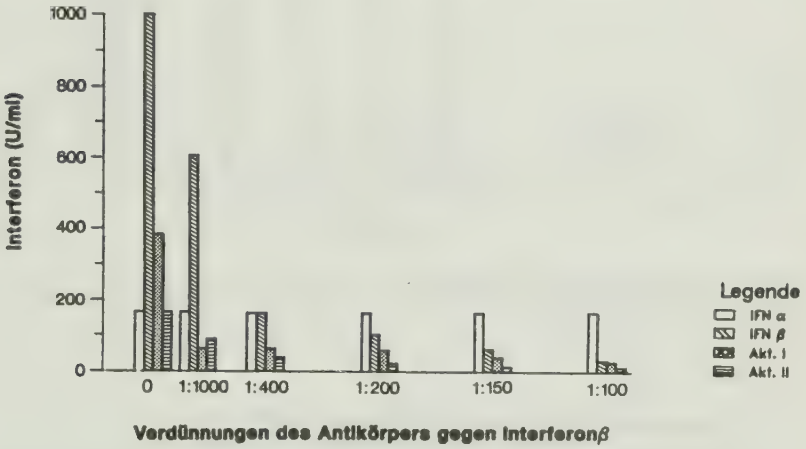


Abb. 11: Neutralisation CMA-induzierter Interferone in Makrophagen durch Antikörper gegen Interferon-ß

3.4.2.3. In vivo Induktion von Interferon durch CMA

Mäusen (C57BL/6) wurden etwa 10 mg CMA intraperitoneal injiziert. 3 h später wurde das Serum gewonnen und nach Dialyse gegen den Startpuffer über die CH-Sepharose 4B-Säule aufgetrennt. Das Serum der Mäuse hatte nach Induktion einen Titer von etwa 38 000 Einheiten/ml. Die Elution von der Säule führte zu drei Aktivitätsspitzen, die erste im Verlauf der Fraktionen 6 bis 10, die zweite nach Anstieg des pH-Werts in den Fraktionen 13 bis 15 und die dritte schließlich im Verlauf der Erhöhung der Ionenstärke in den Fraktionen 23 bis 25. Alle drei Aktivitäten wurden vollständig von Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisiert.

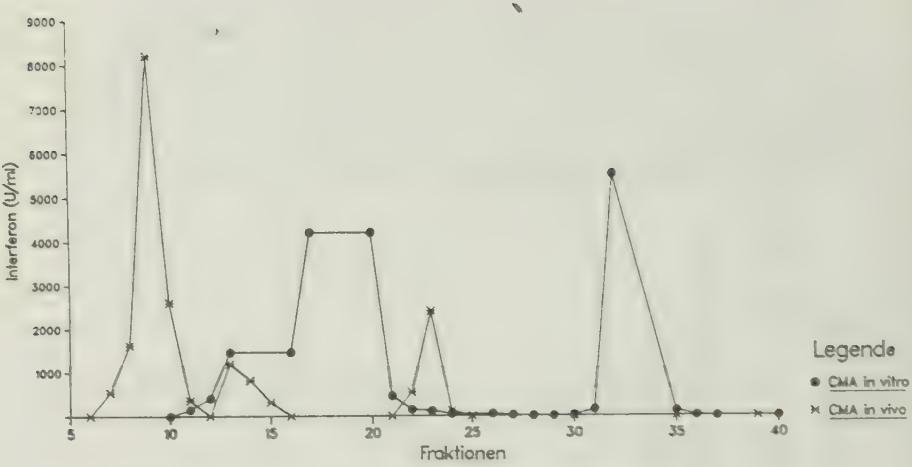


Abb. 12: Elutionsdiagramm in vitro und in vivo erzeugten Interferone nach Induktion mit CMA

3.4.3. In vitro und in vivo Induktion von Interferon durch PIC

Mit 100 /ug PIC wurden sieben bis zehn Tage alte Knochenmarksmakrophagen und mit 100 /ug PIC/Maus (durch intraperitoneale Injektion) induziert.

3.4.3.1. In vitro Induktion von Interferon durch PIC

Die Interferontiter der Kulturüberstände lagen durchschnittlich bei 5000 Einheiten pro ml. Die Auftrennung über die CH-Sepharose 4B-Säule erbrachte zwei Aktivitätsspitzen, eine zwischen den Fraktionen 9 und 13 (PC1) im Bereich des pH Anstiegs und die zweite zwischen den Fraktionen 21 und 25 (PC2) im Bereich des Anstiegs der Ionenstärke. Beide Aktivitäten konnten durch Antikörper gegen Interferon-ß vollständig neutralisiert werden.

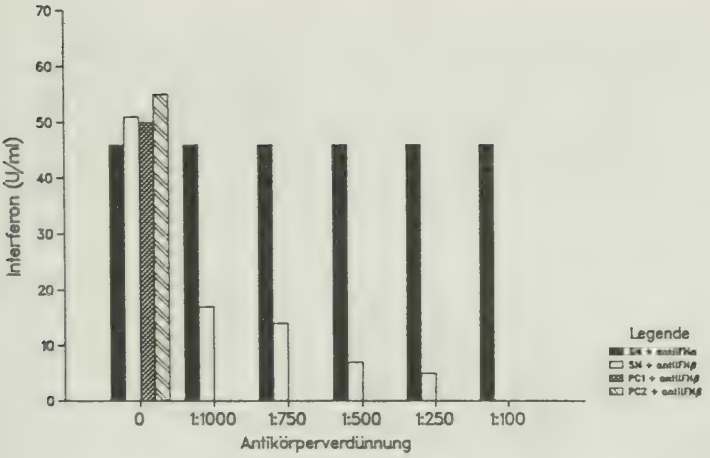


Abb. 13: Neutralisation PIC-induzierter IFN Aktivitäten des Kulturüberstandes (SN) und nach CH-Sepharose 4B Lauf (PC1, PC2)

3.4.3.2. Induktion von Interferon in vivo mit PIC

Die Auftrennung des gegen den Startpuffer dialysierten Serums führte zu einer Aktivitätsspitze in den Fraktionen 5 bis 10, die den größten Anteil der gesamten Interferonaktivität enthielt. Zwei kleinere Aktivitätsspitzen eluierten in den Fraktionen 14 bis 16 und 22 bis 24. Nach Neutralisation mit Antikörpern gegen Interferon-α und Interferon-β konnte keine der eluierten Aktivitäten dem einen oder anderen Subtyp allein zugeordnet werden. Es schien, daß ein Gemisch beider Subtypen gleichzeitig eluiert wurde.

3.4.4. Induktion von Interferon in vitro und in vivo durch NDV

Sieben bis zehn Tage alte Knochenmarksmakrophagen wurden mit 128 hämagglutinierende Einheiten NDV induziert. Die in vivo Induktion erfolgte durch intravenöse Injektion von NDV (0,2 ml, Hämagglutinationstiter von 2^{10}). Nach 3 bzw. 8 h wurde das Serum gewonnen. Sowohl Kulturüberstand als auch Serum wurden für 72 h auf pH 2 gebracht, um restliches Virus zu inaktivieren.

3.4.4.1. Induktion von Interferon in vitro mit NDV

Der Kulturüberstand hatte einen Interferontiter von etwa 15 000 Einheiten/ml. Der gegen den Startpuffer dialysierte Kulturüberstand (SN) ergab nach Chromatographie drei Aktivitätsspitzen, in den Fraktionen 9 bis 14 (NC1) parallel zum Anstieg des pH-Werts, den Fraktionen 16 bis 18 (NC2) während des pH-Plateaus und den Fraktionen 25 bis 27 (NC3) gleichzeitig mit dem Anstieg der Ionenstärke.

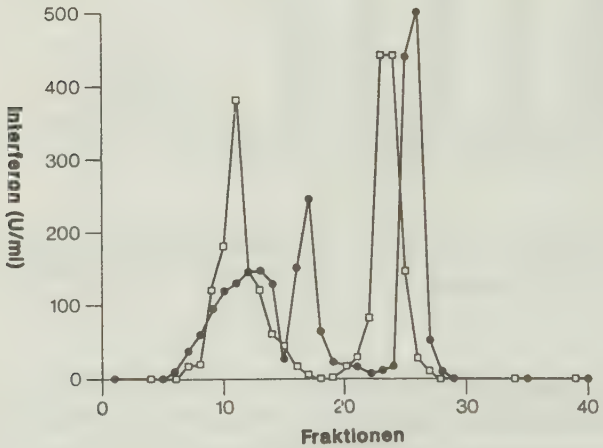


Abb. 14: Elutionsdiagramme PIC und NDV in vitro induzierter Interferonaktivitäten. (●) NDV-induziertes IFN, (□) PIC-induziertes IFN

Die Neutralisation der zwei letzten Aktivitäten erfolgte nur durch Antikörper gegen Interferon-ß. Die erste Aktivitätsspitze konnte zum Großteil durch Antikörper gegen Interferon-ß neutralisiert werden, ein kleiner Anteil durch Antikörper gegen Interferon-α.

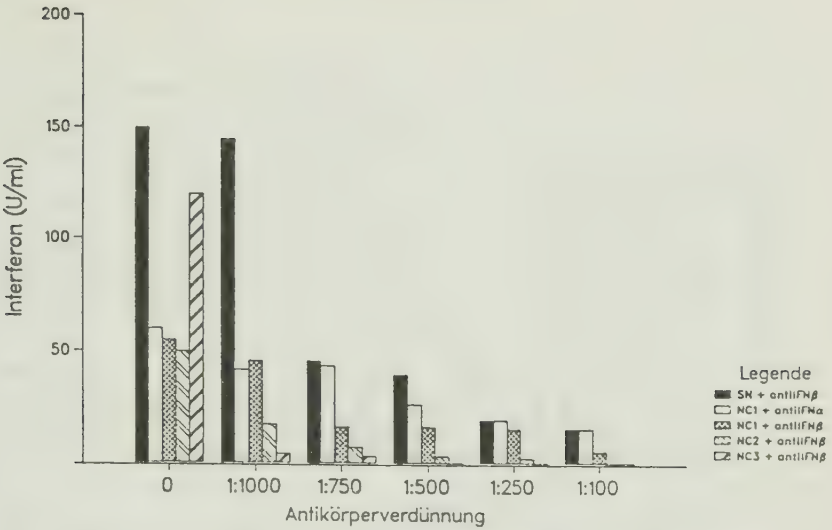


Abb. 15: Neutralisation der von CH-Sepharose 4B-Säule eluierten Aktivitäten mit Antikörper gegen Interferon-α und Interferon-ß, induziert in Makrophagen mit NDV (NC1-NC3) und des Kulturüberstands (SN)

3.4.4.2. Induktion von Interferon in vivo mit NDV

3.4.4.2.1. Auftrennung des Serum-Interferons nach dreistündiger NDV-Induktion

Die Auftrennung des gegen den Startpuffer dialysierten Serums mit einem Interferontiter von etwa 38 000 Einheiten/ml ergab drei Aktivitätsspitzen, in denen die nachgewiesenen Interferonaktivitäten etwa gleichmäßig verteilt waren. Die erste Spitze befand sich in den Fraktionen 6 bis 12, also im Vorlauf, die zweite in den Fraktionen 14 bis 19, eluiert während des pH-Anstiegs, und die dritte in den Fraktionen 22 bis 24, eluiert während des Anstiegs der Ionenstärke.

3.4.4.2.2. Auftrennung des Serum-Interferons nach achtstündiger NDV-Induktion

Das Serum hatte einen Interferontiter von etwa 16 000 Einheiten/ml. Das NDV-induzierte späte (nach 8 h) Seruminterferon hatte das gleiche Elutionsprofil wie das frühe (nach 3 h) Seruminterferon, aber unterschiedliche Verteilung der Aktivitäten. Die in den Fraktionen 6 bis 10 enthaltene Aktivität umfaßte etwa die Hälfte der Gesamtaktivität. Die zweite Aktivitätsspitze war in den Fraktionen 15 bis 18 und die dritte in den Fraktionen 23 bis 25 enthalten.

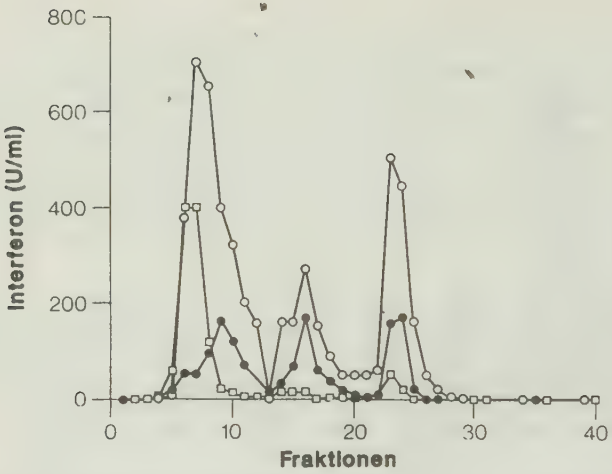


Abb. 16: Elutionsprofil des durch NDV induzierten Seruminterferons (nach 3 h (●) und 8 h (o)) und durch Poly(I)-poly(C)-induzierten Seruminterferons (nach 5 h (□))

Die Neutralisation der ersten zwei Aktivitätsspitzen sowohl bei frühen und späten Seruminterferon erfolgte durch Antikörper gegen Interferon-α und Interferon-β. Die dritte Aktivitätsspitze wurde lediglich von Antikörpern gegen Interferon-β neutralisiert.

Tab. 5: Neutralisation der durch CMA, PIC und NDV induzierten Interferonaktivitäten

Induktor und Interferonquelle	Aktivitäts-spitzen	Neutralisierung durch	
		Anti-IFN-α	Anti-IFN-β
CMA (Makrophagen)	2	-	++
CMA (Serum)	3	-	+++
PIC (Makrophagen)	2	-	++
PIC (Serum)	3	+++	+++
NDV (Makrophagen)	3	+	+++
NDV (Serum nach 3 h)	3	++	+++
NDV (Serum nach 8 h)	3	++	+++

Tab. 6: Interferontiter nach in vitro und in vivo Induktion

	Induktor	Interferontiter in Einheiten/ml
in vitro (in Makrophagen)	CMA	4000-6000
	PIC	4000-6000
	NDV	5000-7000
in vivo (Serum von C57/BL6-Mäusen)	CMA	25000-30000
	PIC	5000
	NDV nach 3 h	38000-40000
	NDV nach 8 h	15000-16000

3.5. Charakterisierung und Quantifizierung induzierter Interferon mRNA

Nach den in vitro Analysen von Interferon in Makrophagen auf Proteinebene folgte als weitere Charakterisierung die Identifizierung der Interferon mRNA, die nach Induktion gebildet wurde. Die Expression des einzelnen Subtyps nach Induktion wurde mit Northern-Blot-Analysen untersucht. Die Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Expression von Interferontranskripten nach Induktion und ihre Quantifizierung erfolgte über Slot-Blot-Analysen. Hybridisierungen wurden mit α^{32}P-markierter cDNA durchgeführt. Die DNA wurde über Nicktranslation markiert, dabei konnten sowohl Inserts als auch Gesamtplasmide eingesetzt werden. Die Hybridisierung mit Gesamtplasmiden erfüllte zwei Aufgaben. Zum einen identifizierte die DNA mit ihrem IFN-Anteil spezifische Interferon mRNA und zum anderen mit ihrem Plasmidanteil den eingesetzten DNA-Marker. Als Marker diente Hinf I verdautes pBR322, das mit seinen größten Fragmenten von 1,6 kb und 0,6 kb die Zuordnung der Interferon mRNA bei 1,2 bis 1,4 kb erlaubte. Pro Versuch wurde etwa 1 ng des Markers eingesetzt. Die radioaktive Markierung von Inserts wurde durch Primerextension, dem Oligolabeling, durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Spezifität der Probe und der hohen radioaktiven Markierung. Zur Charakterisierung von Interferon-ß mRNA wurde die Interferon-ß cDNA und von Interferon-α mRNA die Interferon-α cDNA oder der genomische Interferon-α_2 Klon verwendet (siehe 2.1.9.).

Slot-Blots erlaubten den schnellen Nachweis von RNA und über serielle Verdünnung der RNA mit Puffer die grobe Quantifizierung, die durch Gegenhybridisierung z.B. gegen Aktin kontrolliert wurde. Die RNA wurde wie bei 2.12.1. beschrieben präpariert und führte nach dem CsCl-Gradienten zu einer verhältnismäßig reinen Präparation. Bei der Schnellaufarbeitungsmethode (2.12.2.) ließen sich jedoch DNA-Verunreinigungen nicht vermeiden, außerdem konnten mit einem Ansatz nur zwei bis drei Spuren eines Agarosegels beladen werden. Die auf die Nylonmembran transferierte RNA wurde in 2.16.1. beschriebener Lösung mit 10^6 cpm/ml bei 42-50°C für 18-24 h hybridisiert.

Als Kontrolle diente Gesamt RNA aus der Leber der Maus. Die Leber wurde, um den Zellverband in kleinstmögliche Fragmente aufzutrennen, homogenisiert und dann wie bei 2.12.1. beschrieben weiterverarbeitet. Diese RNA, wie auch RNA aus nicht induzierten Zellen, wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Im Gegensatz dazu diente mRNA aus NDV induzierten C243-Zellen, von der die Präsenz beider Interferon-Subtyp mRNAs bekannt war, als Positivkontrolle.

3.5.1. Hybridisierung von mRNA nach Induktion mit NDV

3.5.1.1. NDV-induzierte mRNA aus C243-Zellen und aus Makrophagen

20-25 µg CsCl-gereinigte Gesamt-RNA aus C243-Zellen (Mausfibroblastenzellen), induziert für 8 h mit NDV (1:10, Stamm Ulster) und aus Makrophagen, induziert für 6 h mit NDV (1:10), wurden glyoxyliert. Nach Auftrennung im Agarosegel und Transferieren auf Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung gegen Interferon-α und -ß cDNA. Die cDNAs hatten eine spezifische Aktivität von 2×10^6 cpm/µg DNA. Die Hybridisierung lief über 20 h bei 50°C. Die Exposition dauerte vier Tage. Das Hybridisierungssignal der in C243 Zellen induzierten mRNA (cNDV) war mit beiden cDNAs etwa gleich stark. In Markophagen induzierter mRNA (NDV) zeigte nur mit der Interferon-ßDNA ein klares Hybridisierungssignal. Die RNA aus nicht induzierten Makrophagen (K-Mϕ) und aus Gesamtleber (Leb-RNA) zeigten kein Signal. NDV induzierte in C243 Zellen sowohl α- als auch ß-Interferon mRNA, wobei die Induktion von Makrophagen nur zu ß-Interferon mRNA-Expression führte. Als Marker diente pBr322 Hinf I verdaut (pBr322).

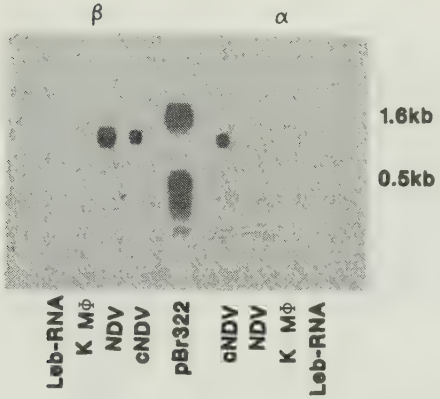


Abb. 17: Induktion von Markophagen und C243-Zellen mit NDV, hybridisiert gegen Interferon-α (α) und Interferon-β (β) cDNA.

3.5.1.2. NDV induzierte Poly A^+-mRNA in Makrophagen

Sowohl aus induzierter als auch aus nichtinduzierter Gesamt-RNA (6 h mit NDV) erfolgte die Präparation von Poly A^+ RNA wie in 2.12.2. beschrieben. Spuren mit NDV-induzierter Poly A^+-mRNA enthielten 2,5 und 5 µg (2,5/5 µg NDV Poly A^+), Spuren mit nicht-induzierter Poly A^+-mRNA 5 µg (K Poly A^+), Spuren mit Gesamt-mRNA NDV-induzierter (für 6 h, NDV 6 h), nicht induzierter Makrophagen (KMΦ), und mRNA aus Mausleber (Leb-RNA) jeweils 20 µg. Die Hybridisierung erfolgte für 18 h bei 43,5°C gegen Interferon-α und Interferon-β cDNA, die durch Oligolabelingmarkierung eine spezifische Aktivität von ca. 2×10^9 cpm/µg DNA erreichten. Als Marker fungierte 1 ng pBR322 Hinf I verdaut (pBR322). Hybridisierungssignale ergaben sich nur mit Interferon-β cDNA. Eine Interferon-α mRNA konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

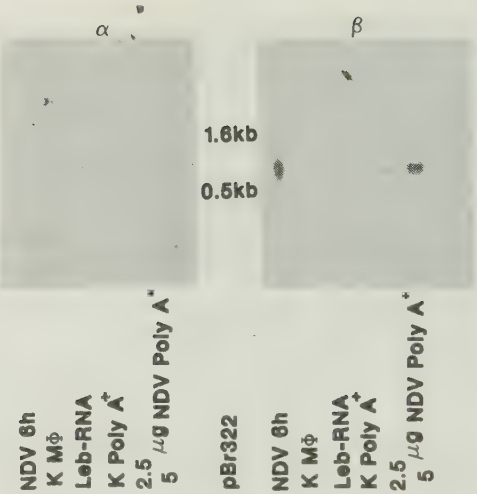


Abb. 18: Hybridisierung von Poly A^+ und Gesamt-mRNA aus Makrophagen mit Interferon-α (α) und Interferon-ß (ß) cDNA.

3.5.2. Induktion von Interferon mit CMA, PIC und NDV in Mausmakrophagen

Die Induktion von Interferon m-RNA in Makrophagen erfolgte mit 500 /ug pro ml CMA für 2, mit 100 /ug/ml PIC für 4 und mit NDV (HA 128) für 6 h. Jeweils 25-30 /ug der RNA-Präparation wurden in Parallelansätzen gegen Interferon-α und Interferon-ß cDNA hybridisiert. Die spez. Aktivität für Interferon-α cDNA war 8, 23 x 10^6 cpm/ug DNA und 4,13 x 10^8 cpm/ug DNA für Interferon-ß cDNA. Die Hybridisierung dauerte 20 h bei 42°C und die Expositionszeit acht Tage. Signale von RNA nach zwei- und dreistündiger Induktion mit CMA (CMA 2 h, CMA 3 h), sowie nach 6 h Induktion mit NDV (NDV 6 h) traten nur bei der Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA auf.

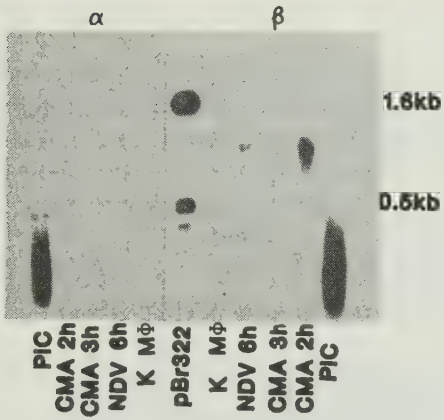


Abb. 19: Induktion von Interferon mRNA in Makrophagen mit CMA, PIC und NDV; Hybridisierung mit Interferon-α (α) und Interferon-β (β) cDNA

Das Hybridisierungssignal für Interferon mRNA nach 2 h CMA Induktion war deutlich höher als bei 3 Stunden Induktion, obwohl der Aktin-Gegenblot (Maus-αAktin cDNA) keine Unterschiede aufwies. Das ließe bei durch CMA induzierter RNA auf ein zeitlich sehr frühes Maximum schließen, etwa bei einer Induktionszeit von 2 h. Auch in diesem Versuch schien nach NDV-Induktion in Makrophagen nur Interferon-β mRNA exprimiert zu werden. Durch PIC induzierte mRNA (PIC) konnte kein spezifisches Signal nachgewiesen werden, aber im Bereich unter 0,5 kb befanden sich die Polynukleotide, die zur Induktion eingesetzt wurden und nicht durch mehrmaliges Waschen abgetrennt werden konnten. In einem Kontrollgel waren die ribosomalen Banden (18 und 28 S) gut zu erkennen, die RNA war also vollkommen intakt.

3.5.3. Induktionskinetik von mRNA aus Makrophagen induziert mit CMA und NDV

Die RNA für die einzelnen Zeitpunkte wurde aus einer 9 cm Petrischale präpariert. Makrophagen wurden für 2, 4, 6 und 10 h mit CMA (CMA 2 h, CMA 4 h, CMA 6 h, CMA 10 h) und für 4, 6, 10 und 24 h mit NDV (NDV 4 h, NDV 6 h, NDV 10 h, NDV 24 h) induziert. Der Monolayer wurde zur RNA-Präparation eingesetzt und der Überstand auf Interferon austitriert. Da bei dieser Präparationsmethode keine Quantifizierung der RNA vorgenommen werden konnte,

mußte darauf geachtet werden, daß die gleiche Zellzahl (ca. 4 x 10^6 Zellen pro Schale) in die RNA-Präparation eingesetzt wurde. Nur dadurch ergab sich die Möglichkeit, unter der Annahme, daß die Präparation der RNA aus jedem Ansatz gleich war, in etwa die verschiedenen Ansätze bezüglich ihrer von der Zeit abhängigen unterschiedlichen Expression zu vergleichen. Bei der Hybridisierung gegen die verschiedenen Subtypen an Interferon cDNA konnten die einzelnen Ansätze direkt miteinander verglichen werden, da ein Aliquot jedes Ansatzes für die unterschiedliche Hybridisierung eingesetzt wurde.

Abb. 20: Kinetik der RNA Expression nach Induktion mit CMA und NDV; hybridisiert mit Interferon-α (α) und Interferon-β (β) cDNA

Bei dieser Hybridisierung wurden die Interferon-α cDNA und -ß cDNA durch die Primerextensionmethode markiert, die spezifische Aktivität lag etwa bei 6×10^8 cpm pro /ug DNA für beide Subtypen. Hybridisiert wurde für 20 h bei 44°C. Bei dieser Präparationsmethode blieb immer ein Restanteil an DNA, der aber wie in Abb. 20 zu erkennen keinen Einfluß auf die spezifischen RNA-Signale hatte. Die Expression von CMA-induzierter Interferon RNA konnte nur durch Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA gezeigt werden. Nach zweistündiger CMA Induktion wurde das Maximum an RNA-Expression erreicht.

Über einen Zeitraum von 8 h nahm die RNA Menge wieder ab bis nach 10 h RNA-Induktion kein mRNA mehr nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu war die RNA Expression nach NDV Induktion zwischen 6 und 10 h am höchsten, trat erst nach 4 h Induktion auf und war nach 24 h nicht mehr nachweisbar. Ein Hybridisierungssignal mit Interferon-α cDNA war nicht zu erkennen.

Tab. 7: Kinetik der Interferon-Induktion in Makrophagen mit CMA und NDV

IFN-Titer nach	IFN (U/ml) Induktor	
	CMA	NDV
2 h	1460	-
3 h	4800	400
6 h	5000	1530
10 h	11600	4850
24 h	-	13000

3.5.4. Detektion eines Interferon-α mRNA-Signals nach NDV-Induktion von Makrophagen

CsCl gereinigte RNA aus 6 h mit NDV induzierten Makrophagen und C243-Zellen wurden mit Interferon cDNA hybridisiert. Die Markierung mit α^{32}P dCTP erfolgte durch Primerextensionmethode, wobei α2-DNA-Insert und pMß-3 Insert eine spezifische Aktivität von etwa 1×10^9 cpm/ /ug aufwiesen. Die Hybridisierung dauerte 24 h bei 44°C. Etwa 40 /ug Gesamt-RNA waren pro Spur aufgetragen. Bei der Hybridisierung von RNA aus induzierten C243-Zellen (cNDV) mit beiden Subtypen von Interferon DNA konnte ein etwa gleich starkes Signal nachgewiesen werden.

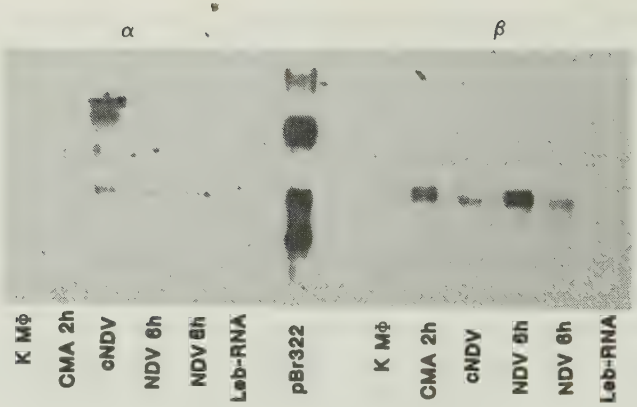


Abb. 21: Northern Blot mit Interferon m-RNA aus NDV induzierten Makrophagen und C243-Zellen hybridisiert mit Interferon-α (α) und Interferon-β (β) DNA.

Die Hybridisierung von NDV induzierten Makrophagen RNA (NDV 6 h) mit Interferon-β cDNA ergab ein starkes Signal, mit Interferon-α2-DNA ein um ein vielfach schwächeres Signal. Kontrollspuren mit RNA aus nicht induzierten Makrophagen (KMΦ) und Gesamt Leber RNA (Leb-RNA) zeigten mit keiner der beiden Interferon cDNA ein Hybridisierungssignal.

3.5.5. Kinetik der RNA-Expression und Interferontiter nach NDV- und CMA-Induktion von Makrophagen

Makrophagen wurden mit NDV für 2 h (NDV 2 h), 4 h (NDV 4 h), 6 h (NDV 6 h), 8 h (NDV 8 h), 10 h (NDV 10 h), 14 h (NDV 14 h) und 24 h (NDV 24 h) induziert. Aus den Monolayern wurde RNA präpariert und über einen CsCl Gradienten gereinigt. Die Kulturüberstände wurden auf Interferon ausgetestet. Die RNA der jeweiligen Ansätze (à 20 µg) wurden in Slot Blots seriell 1:2 verdünnt und untereinander verglichen. Die RNA-Präparation, die bei der Hybridisierung gegen Interferon β-cDNA das stärkste Signal ergab, wurde als 100 Prozent Hybridisierung definiert. Die anderen Präparationen wurden abhängig von der Stärke ihres Hybridisierungssignals als Teil in Prozent berechnet.

Die mRNA aus 8 h mit NDV induzierten Zellen zeigte das stärkste Hybridisierungssignal. mRNA-Präparation aus 4 h und 14 h induzierten Makrophagen ergaben etwa 1/10 der Maximalhybridisierung. 24 h nach Induktion konnte keine mRNA mehr nachgewiesen werden. Die Interferontiter stiegen im Verlauf der Kinetik stetig an und erreichten nach 24 h 18 000 Einheiten. Nach der Induktion mit CMA war das Maximum der Interferon mRNA-Expression schon nach 2 h erreicht. Im Verlauf von 6 h verringerte sich die RNA-Menge bis 10 h nach Induktion keine mRNA mehr nachgewiesen werden konnte. Auch hier stieg der Interferontiter kontinuierlich an bis nach 24 h 14 000 Einheiten bestimmt werden konnten. Schon 2 h nach Induktion wurden 3000 Einheiten gemessen.

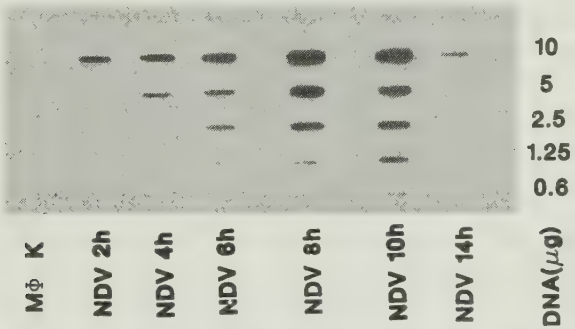


Abb. 22: Induktionskinetik NDV-induzierter Makrophagen hybridisiert mit Interferon-ß cDNA

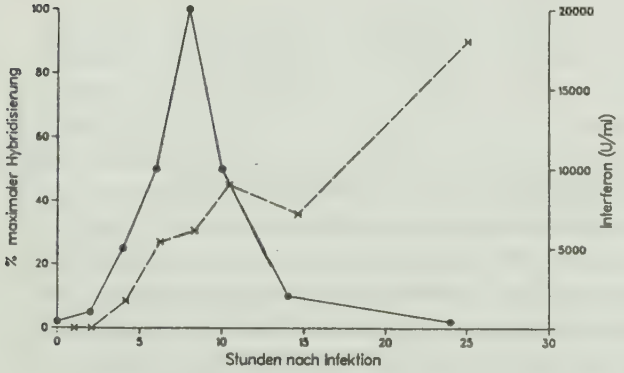


Abb. 23: Vergleich von mRNA (●) und Interferontiter (*) in NDV-induzierten Makrophagen

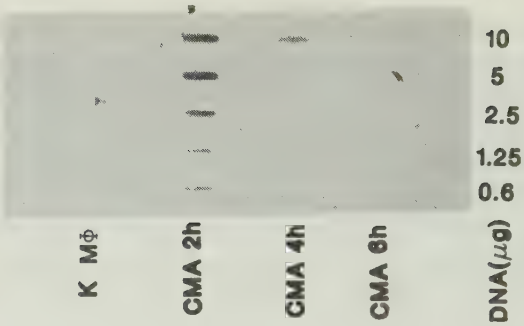


Abb. 24: Induktionskinetik CMA induzierter Makrophagen hybridisiert mit Interferon-ß cDNA

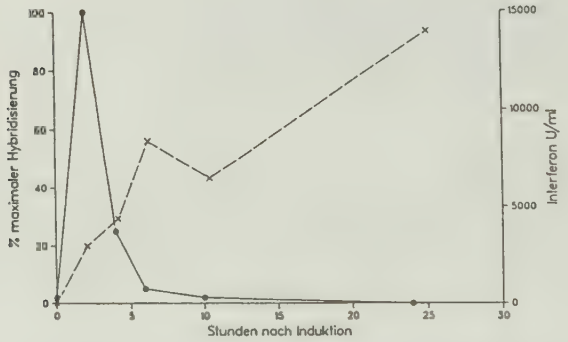


Abb. 25: Vergleich von mRNA (●) und Interferontiter (*) in CMA-induzierten Makrophagen

3.5.6. Hybridisierungssignal mit mRNA aus nichtinduzierten Zellen

Bei der Hybridisierung nichtinduzierter Zellen (KMΦ) mit Interferon-α und -ß cDNA,aber auch bei der von CMA induzierten Makrophagen mit Interferon-α cDNA fanden sich schwache Signale, die nach längerer Expositionszeit (16 bis 20 Tage) auftraten. Wurde dagegen gegen Leber Gesamt RNA (Leb) bei Einsatz gleicher Menge an RNA hybridisiert, so gab es keine Signale. Die Hybridisierungssignale waren sehr gering im Verhältnis zur "Normalinduktion", zum Beispiel von für mRNA aus 2 h mit CMA induzierten Makrophagen.

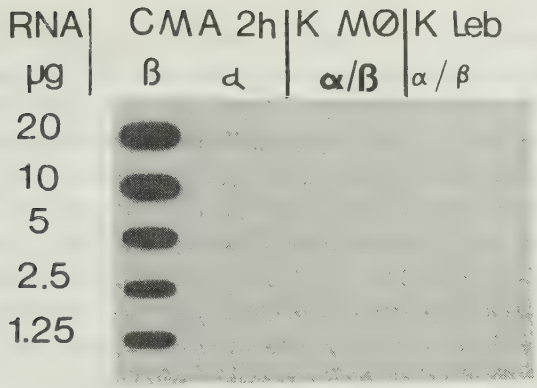


Abb. 26: Hybridisierung von α- und ß-cDNA mit mRNA aus nichtinduzierten und mit CMA-induzierten Zellen

Das in nichtinduzierten Zellen erzeugte Signal könnte auf eine minimale Interferonproduktion hinweisen, deren Ursache in den Kulturbedingungen der Makrophagen liegt. Die Makrophagen wurden in konditioniertem Medium, das einen Wachstumsfaktor enthielt, kultiviert.

3.6. Run-on-Transkription

Mit der Run-on-Transkription sollte die mRNA nachgewiesen werden, die nach Induktion neu gebildet wurde. Durch Hybridisieren mit spezifischer DNA, Interferon-α und -ß DNA könnte in Abhängigkeit von der Induktionszeit der Startpunkt der Transkription und der Typ der transkribierten mRNA bestimmt werden. Diesen wurde als Kontrolle RNA aus nichtinduzierten Zellen (Makrophagen) gegenübergestellt. Zu Anfang wurden die DNA-Präparationen wie bei 2.17. beschrieben vorbehandelt und auf Nylonmembran fixiert. Neben Interferon-α und -ß cDNA wurden weitere DNA-Präparationen eingesetzt, die als Positiv- und Negativkontrollen dienten. Als Positivkontrolle wurden DNA aus Mausleber, Maus-α Aktin cDNA (Aktin), sowie H-2K^{k} cDNA- (Bestandteil des MHC-Komplex der Maus) Klone eingesetzt. Der Vektor pGem1 war als Negativkontrolle vorgesehen. Die Induktionszeiten für NDV waren 3 und 4 h, für CMA 1/2 h, 1 h

und 1 1/2 h. Danach wurde der Überstand abgenommen, der Interferontiter bestimmt und aus den Makrophagen die Kerne präpariert. Die Interferontiter nach CMA-Induktion bewegten sich zwischen null und fünf Einheiten und die der NDV-Induktion zwischen fünf und 120 Einheiten. Die radioaktiv markierte RNA der verschiedenen Präparationen wurden auf 3-5 x 10^6 cpm Gesamtradiaoktivität eingestellt. Die Hybridisierung dauerte 20 bis 24 h bei 44°C. Die Hybridisierungen ergaben, daß DNA aus Mausleber das stärkste Signal gab und zwar etwa gleich stark in jeder Präparation. Ein für alle Präparationen gleich starkes Hybridisierungssignal wurde auch für H2-K^k cDNA erhalten. Die Hybridisierungssignale mit αAktin cDNA von mRNA aus Präparationen induzierter Ansätze waren schwächer als mit mRNA aus nicht induzierten Makrophagen (nicht induz. Mϕ). Bei der Hybridisierung mit pGem1 traten keine Signale auf. Unabhängig vom Zeitpunkt der RNA-Präparation konnten keine eindeutigen Signale weder nach Induktion mit CMA oder NDV für Interferon-α noch für Interferon-β nachgewiesen werden.

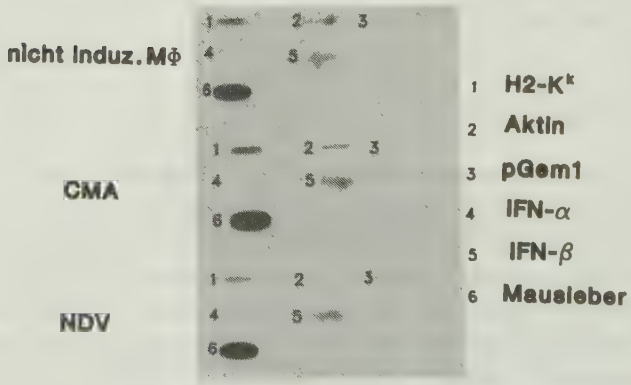


Abb. 27: Hybridisierung radioaktiv markierter mRNA aus Makrophagen mit DNA der Maus.

3.7. In situ Hybridisierung

Makrophagen wurden mit NDV und CMA analog der Northernblot-Analyse induziert. In den Kulturüberständen wurden die Interferontiter bestimmt und die Zellen auf Objektträger zentrifugiert. Die Hybridisierung erfolgte gegen Interferon-ß cDNA oder gegen Interferon-α cDNA, die mit α^{32}P oder α^{35}S dNTP markiert waren. Die Hybridisierung lief etwa 20 h bei 38-42°C. Nach Überschichten mit der Fotoemulsion wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitspannen exponiert. Die Auswertung erfolgte durch Gegenüberstellung der Anzahl der Silberkörnchen über induzierten und nichtinduzierten Zellen oder Zellen, die mit RNase vorbehandelt waren. Die Verteilung der Zellen in verschiedene Größenordnungen an Silberkörnchen (0-5, 6-10 etc.) und die Verschiebung der Zellen induzierter Ansätze hin zu höheren Größenordnungen (71-100, 101-200) erlaubte eine Aussage, ob Ansätze induziert und in welchem Ausmaß sie induziert waren. Um eine möglichst objektive Auswertung zu gewähren, wurden zufällig ausgewählte Areale intakter Zellen ausgewertet. Insgesamt wurde die absolute Anzahl von Silberkörnchen, über ein- bis zweihundert Zellen ausgezählt und als Histiogramm aus Anzahl der Silberkörnchen pro Zelle gegen Prozent an Zellen einer bestimmten Größenordnung an Silberkörnchen dargestellt.

3.7.1. Induktion von Makrophagen mit NDV

NDV behandelte Makrophagen wurden für 2 und 6 bis 8 h induziert und zur Hybridisierung eingesetzt. Die radioaktiv markierte DNA-Menge pro Ansatz betrug 1,5 ng mit einer spez. Aktivität von $1{,}3 \times 10^8$ cpm pro µg DNA. Bei der Hybridisierung von Makrophagen, 2 h mit NDV induziert, mit IFN-α cDNA konnte kein positives Signal nachgewiesen werden. Obwohl 8% der Zellen mehr als 20 Silberkörner hatten, die es bei nichtinduzierten Zellen nicht gab, war im Vergleich zur RNase-Kontrolle induzierter Zellen keine Veränderung bezüglich Verteilung der Silberkörner je Zelle vorhanden. 2 h nach NDV-Induktion konnte noch kein Interferon im Überstand nachgewiesen werden.

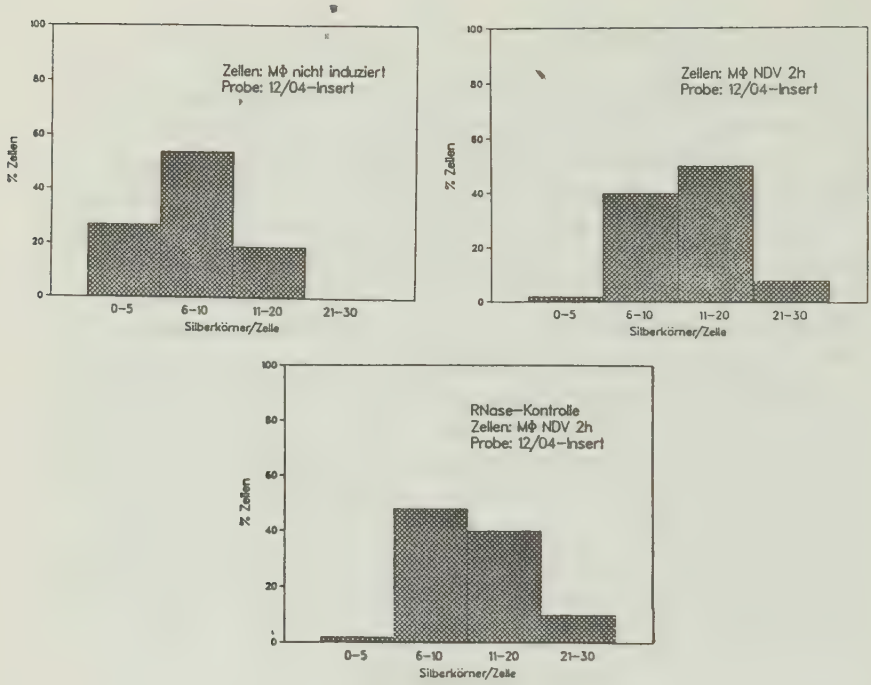


Abb. 28: Induktion mit NDV für 2 h und Hybridisierung mit Interferon-α cDNA (MΦ: Makrophagen, 12-04: Interferon-α cDNA)

Die mRNA aus Makrophagen wurden 6 h nach NDV Induktion mit Interferon-α cDNA hybridisiert. Die radioaktiv markierte DNA-Menge waren pro Ansatz 1,5 ng (spezifische Aktivität 1,3 x 10^8 cpm pro µg DNA). Auch hier trat eine deutliche Verschiebung zu höherer Silberkörnerzahl pro Zelle zu Gunsten der induzierten Zellen gegenüber nicht induzierten Zellen auf. 37% aller Zellen hatten 20 und mehr Silberkörner, während alle nicht-induzierten Zellen weniger als 20 Silberkörner aufwiesen. Im Vergleich zur RNase-Kontrolle mußte dieses Signal relativiert werden. So enthielten über 83% der induzierten Zellen mehr als 10 Silberkörner im Gegensatz zu 38% bei der RNAse-Kontrolle. Vergleicht man den Anteil an Zellen mit einer höheren Silberkörnerzahl von induzierten

Zellen und RNase behandelten Zellen, so hatte gerade 1% der induzierten Zellen mehr als 50 Silberkörner. Bei dieser Induktion könnte höchstens ein geringes Signal vorhanden sein. Der Interferontiter nach 6 h NDV-Induktion lag bei 320 Einheiten pro ml.

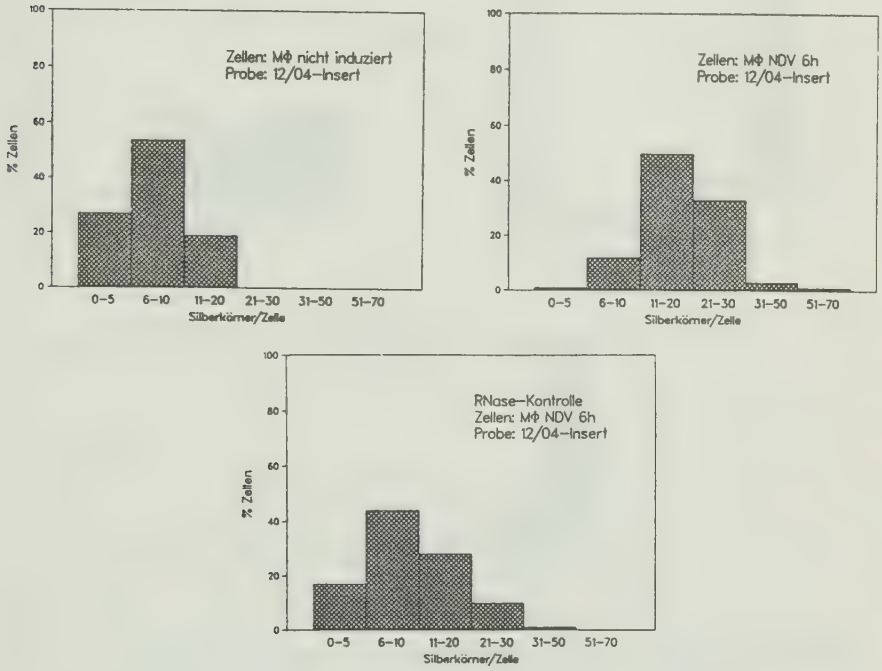


Abb. 29: Induktion mit NDV für 6 h und Hybridisierung mit Interferon-α cDNA (12-04) (Mϕ: Makrophagen)

Die Hybridisierung von IFN-ß cDNA mit NDV induzierten Makrophagen zeigte nach zweistündiger Inkubationszeit ein schwaches aber durchaus signifikantes Signal. Nichtinduzierte Zellen als auch RNase-Kontrollzellen hatten maximal 20 Silberkörner pro Zelle. 7% der induzierten Zellen enthielten dagegen bis zu 50 Silberkörnchen. Die Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA wurde mit 3 ng DNA pro Ansatz und einer spezifischen Aktivität von 2×10^8 cpm pro /ug DNA

durchgeführt, das entspricht etwa 6×10^5 cpm pro Ansatz. Nach zweistündiger NDV Induktion konnte noch kein Interferon nachgewiesen werden.

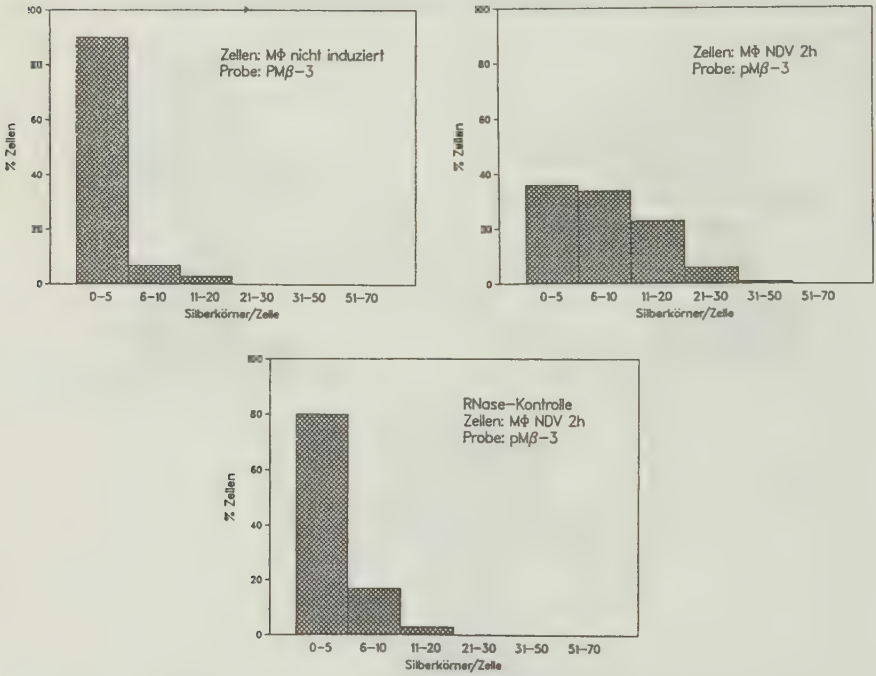


Abb. 30: Induktion der Makrophagen mit NDV für 2 h und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA (MΦ: Makrophagen)

Nach 6 h Induktion mit NDV wurden Makrophagen für die in situ Hybridisierung eingesetzt. Die Counts pro Ansatz entsprachen denen der 2 h Induktion mit NDV. Sowohl nicht induzierte Makrophagen als auch induzierte Zellen, jedoch mit RNase vorbehandelt, hatten nur noch maximal 3% Zellen bis zu 20 Silberkörnchen. Der gleichen Anzahl an Silberkörnchen konnten 44% induzierten Zellen zugeordnet werden. Darüber hinaus enthielten 43% der Zellen mehr als 20 Silberkörnchen, von denen allein 13% zwei bis dreifach mehr Silberkörnchen enthielten, also bis zu 50 Silberkörnchen je Zelle, als der Background nicht induzierter oder

mit RNase behandelter Zellen. Die Interferontiter nach sechstündiger Induktion lagen bei 500 Einheiten pro ml.

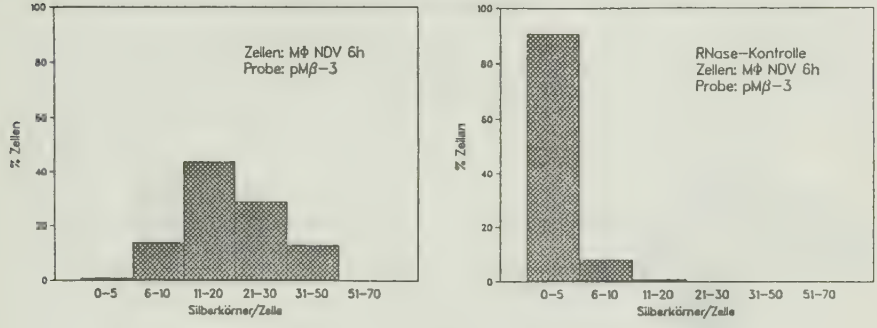


Abb. 31: Induktion mit NDV für 6 h und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA (Mφ: Makrophagen)

3.7.2. Induktion von Makrophagen mit CMA

Die RNA Makrophagen, induziert für 2, 4 und 6 h mit CMA, wurde zur Hybridisierung gegen Interferon-α cDNA und Interferon-ß cDNA eingesetzt. Bei der Hybridisierung von Interferon-α cDNA gegen mRNA aus Makrophagen, induziert für 2 oder 6 h, konnten keine positiven Signale nachgewiesen werden, d.h., daß die Zahl der Silberkörner nicht über der der RNase-Kontrolle oder nichtinduzierter Zellen lag. Bei der Hybridisierung gegen Interferon-ß cDNA konnten je nach Induktionsdauer eine unterschiedliche Signalstärke ermittelt werden. Die DNA-Menge waren 0,5 ng und die Zahl der Counts $1{,}23 \times 10^5$ pro Ansatz. Die radioaktiv markierte Probe hatte eine spezifische Aktivität von $4{,}23 \times 10^8$ cpm pro /ug DNA. Sowohl die nicht induzierten Zellen als auch die Zellen der RNase-Kontrolle enthielten nicht mehr als 20 Silberkörnchen. In induzierten Zellen (2 h mit CMA) hatten 66% der Zellen zwischen 20 und 50 Silberkörnchen und gar 11% drei bis fünffach mehr Silberkörnchen als die Kontrolle, d.h., in ihnen konnten zwischen 50 und 100 Körnchen gezählt werden.

Dieses deutliche Signal konnte nach Hybridisierung von 4 h mit CMA induzierten Makrophagen mRNA nicht gesehen werden. Wie in nicht induzierten

Zellen, als auch in der RNase-Kontrolle fanden sich Zellen, die bis zu 20 Silberkörnchen enthielten. Bei der RNase Kontrolle hatten 98% aller Zellen weniger als 10 Silberkörnchen, während dieser Anteil bei nichtinduzierten Zellen lediglich 18% ausmachte. In induzierten Zellen enthielten 34% der Zellen zwei bis dreifach mehr Silberkörnchen als die Kontrollen. In 14% der Zellen konnten zwischen 30 und 50 Silberkörnchen gezählt werden. 76% lagen jedoch noch im Bereich der nicht induzierten Zellen. Hier gab es ein schwach positives aber doch signifikantes Signal.

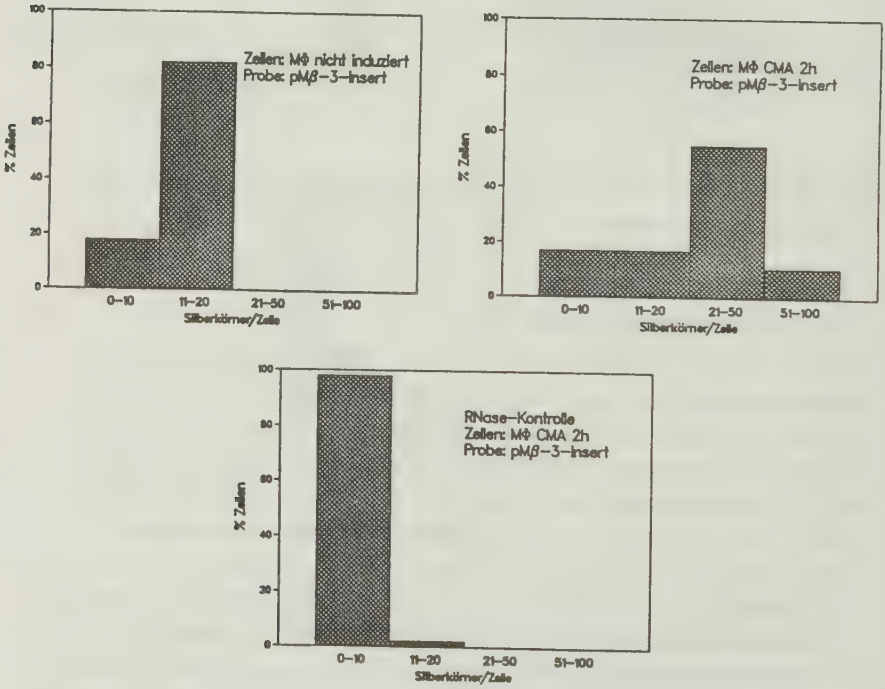


Abb. 32: Induktion mit CMA für 2 h und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA (Mϕ: Makrophagen, pMß-3: Interferon-ß cDNA)

Die Interferontiter lagen für Induktion mit CMA für 2 h bei 140, für 4 h bei 7000 und für 6 h bei 8100 Einheiten/ml.

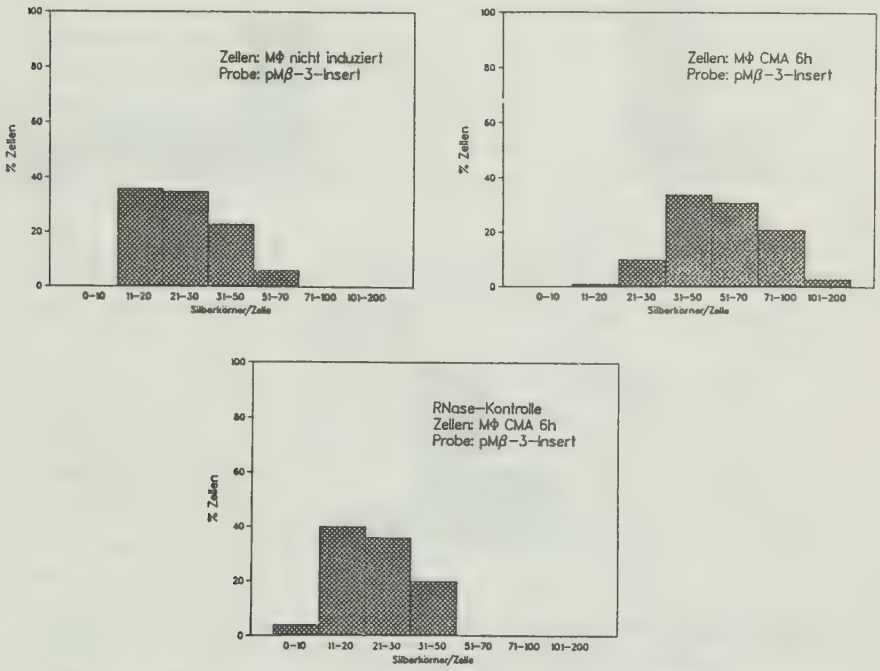


Abb. 34: Induktion mit CMA für 6 h und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA (Mϕ: Makrophagen, pMß-3: Interferon-ß cDNA)

Die Hybridisierung eines Gemischs aus Interferon-α cDNA und Interferon-ß cDNA mit mRNA induzierter Makrophagen führte im wesentlichen zu den schon beschriebenen Ergebnissen bei Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA allein. Bei allen Ansätzen auch bei der Hybridisierung mit nicht induzierten Makrophagen konnte eine Verschiebung zu höherer Silberkörnerzahl beobachtet werden. Die Spezifität des Signals wurde beibehalten und konnte durch RNase-Behandlung auf das Niveau nichtinduzierter Makrophagen reduziert werden.

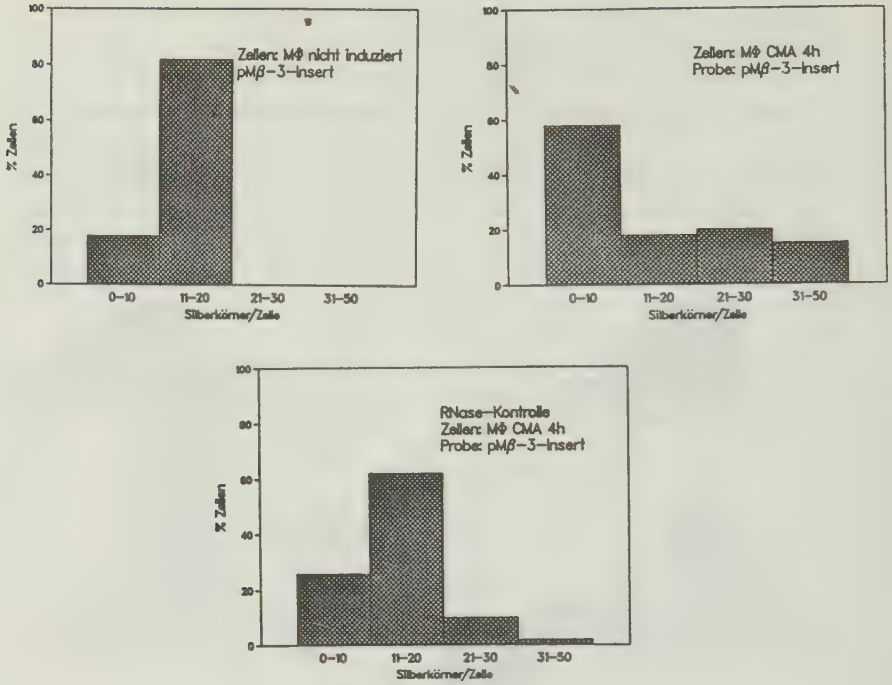


Abb. 33: Induktion mit CMA für 4 h und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA (Mø: Makrophagen, pMß-3: Interferon-ß cDNA)

Die Induktion von Makrophagen für 6 h mit CMA und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA ergab deutliche Signale. Hybridisiert wurde mit 0,3 ng DNA und $1{,}6 \times 10^6$ cpm pro Ansatz. Die markierte cDNA hatte eine spezifische Aktivität von $1{,}27 \times 10^9$ cpm/µg DNA. Wahrscheinlich auf Grund der hohen Aktivität und der hohen IFN-Titer nach Induktion enthielten die Zellen eine große Zahl an Silberkörnchen.

Nicht induzierte Zellen enthielten bis zu 70 Silberkörner, RNase-Kontrollen bis zu 50 Silberkörner pro Zelle. 24% aller induzierten Zellen hatten zwischen 70 und 200 Silberkörner, das bedeutete ein zwei bis dreifach höheres Signal als bei den Kontrollen. Dem Bereich bis zu 70 Silberkörner konnten nur 5% der nicht induzierten Zellen, aber 31 Prozent der induzierten Zellen zugeordnet werden.

3.7.3. Induktion von Makrophagen und Hybridisierung mit einer ^{32}P-markierten cDNA

Makrophagen wurden für 2 h mit CMA und für 8 h mit NDV induziert. Die Hybridisierung erfolgte mit Interferon-ß cDNA, die sowohl ^{35}S als auch ^{32}P markiert war. Etwa 2 x 10^6 counts und 0,8 ng DNA wurden pro 10 µl Ansatz eingesetzt. Die spezifische Aktivität lag bei 2 x 10^8 cpm/µg DNA bei der α^{35}S-Markierung und bei 1,3 x 10^8 counts/µg DNA bei der α^{32}P-Markierung. Die Expositionszeit für α^{32}P-Markierung war nur etwa halb so lang (9 Tage) wie bei α^{35}S-Markierung.

Die Signalverteilung bei den Kontrollansätzen (Makrophagen nicht induziert) zeigten wie die RNase Kontrollen keine Unterschiede bzgl. ihres radioaktiven Nukleotids. Die induzierten Ansätze, mit α^{32}P markierter cDNA hybridisiert, zeigten ein deutliches Hybridisierungssignal. Im Verhältnis zu den α^{35}S-markierten Ansätzen, die unter keinen Umständen mehr als 50 Silberkörner pro Zelle aufwiesen, enthielten 5% der mit NDV induzierten Zellen bis zu 100 Silberkörner. In CMA induzierten Zellen konnten 18% mit mehr als 50 und bis zu 200 Silberkörner pro Zelle gezählt werden. Ein Vergleich innerhalb des α^{32}P-Versuchs zwischen Kontrollen (nicht induzierte Zellen) und mit CMA oder NDV induzierten Zellen zeigte ein deutliches Hybridisierungssignal. So hatten Kontrollen maximal 20 Silberkörner pro Zelle. In CMA induzierten Ansätzen hatten mehr als die Hälfte aller Zellen (53%) mehr als 20 Silberkörner. Daraus ergab sich eine Erhöhung des Signals um das zwei bis Zehnfache. Selbst bei der verhältnismäßig geringen Anzahl an Zellen mit spezifischem Signal hatten 27% der NDV-induzierten Makrophagen mehr Silberkörner als die Kontrollzellen. Das entspricht etwa einer Erhöhung des Signals um das Zwei- bis Dreifache.

Die Interferontiter CMA-induzierter Makrophagen (2 h) lagen bei 8000 Einheiten pro ml und der NDV-induzierten Makrophagen (8 h) lagen bei 14600 Einheiten/ml.

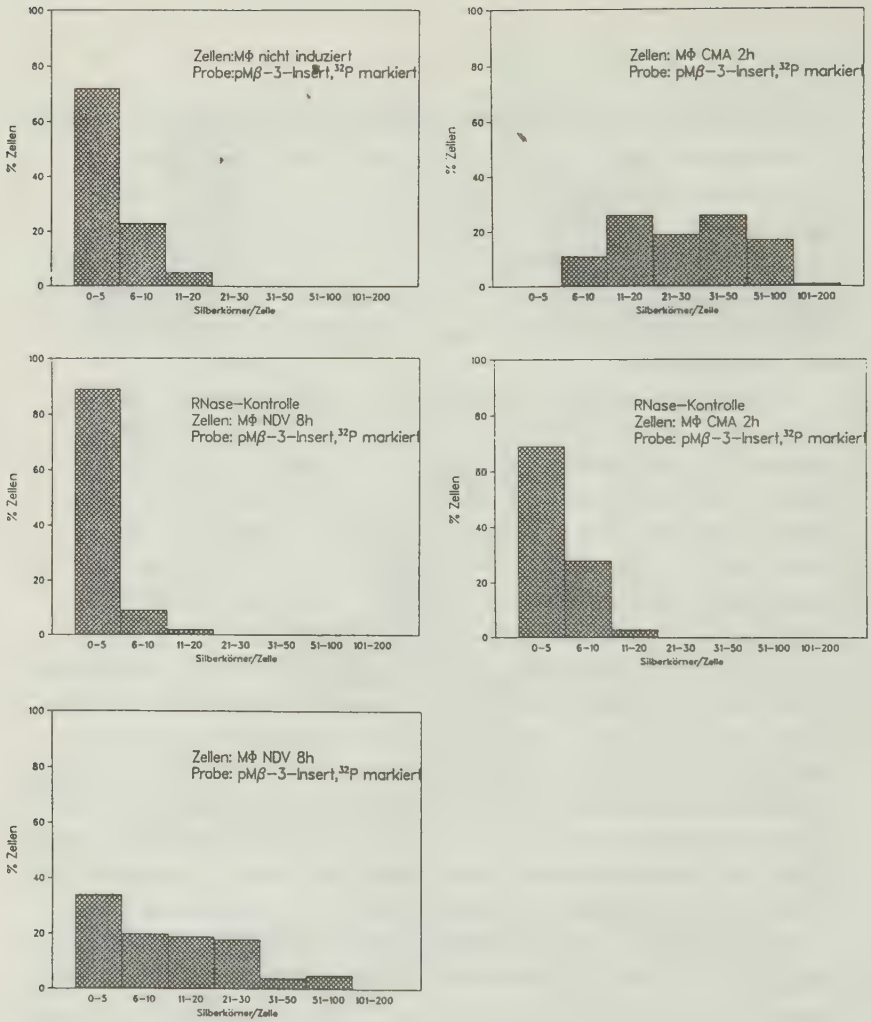


Abb. 35: Induktion mit CMA für 2 h und NDV für 8 h und Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA, $\alpha^{32}P$ markiert (MΦ: Makrophagen, pMß-3: Interferon-ß cDNA)

3.7.4. RNase Behandlung nichtinduzierter Zellen und Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNAs

Die Kontrollansätze wurden einem RNase-Verdau ausgesetzt. Anschließend wurden sie der Hybridisierungsprozedur unterzogen und die Silberkörner über

ihren Zellen ausgezählt. Dabei trat ein Phänomen auf, das sich in fast allen in situ Hybridisierungen manifestierte. Die mit RNase vorverdauten Kontrollen hatten zum Teil erheblich weniger Silberkörner pro Zelle als unbehandelte Kontrollen. Die Umverteilung der Silberkörner nach RNase Behandlung konnte bei jeder eingesetzten cDNA nachgewiesen werden und war auch nicht von der radioaktiven Markierung ($\alpha^{32}P$ oder $\alpha^{32}S$ dNTP) abhängig. Das könnte bedeuten, daß in Kontrollzellen, aber wahrscheinlich auch in induzierten Zellen ein von der Induktion unabhängiges aber RNase sensitives Signal erscheint.

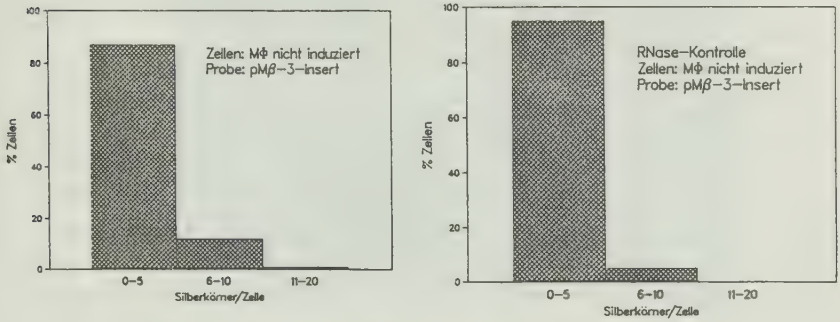


Abb. 36: Nichtinduzierte Zellen ohne und mit RNase-Vorbehandlung, Hybridisierung mit Interferon-ß cDNA (MΦ: Makrophagen)

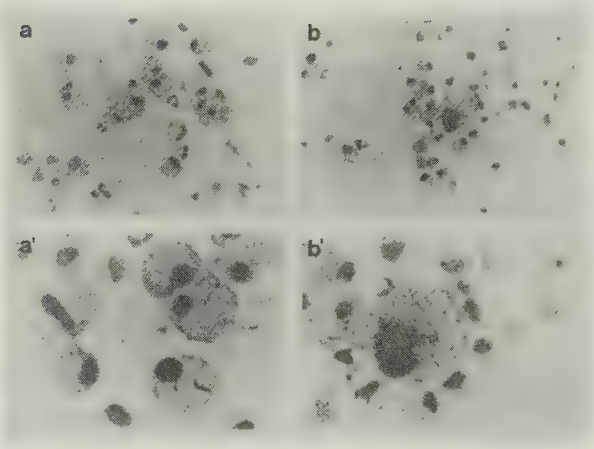


Abb. 37: in situ Hybridisierung nichtinduzierter und induzierter Makrophagen a und a': nicht induzierte Zellen, b und b': induzierte Zellen, a und b: 500fache Vergrößerung, a' und b': 1250fache Vergrößerung

3.7.5. Vergleich von Spezifität des Hybridisierungssignals mit anderen Parametern

3.7.5.1. Gesamtplasmid oder Insert der cDNA als spezifische Probe

Da bei Verwendung von Gesamtplasmid unspezifischere Hybridisierungen auftreten könnten, unter Verminderung des spezifischen Signals, wurden Interferon cDNA-Inserts zur Hybridisierung eingesetzt. Es konnte aber beobachtet werden, daß durch Verwendung von Gesamtplasmiden kein höherer Background an Silberkörnchen erzeugt wurde. Die Spezifität des Signals konnte durch Hybridisierung

mit Inserts im Verhältnis zur Hybridisierung mit Gesamtplasmid bei gleichem Background erhöht werden, teilweise um das Mehrfache. Die Kontrollansätze, hybridisiert mit Insert oder Gesamtplasmid,lassen sich weder auf ihre Signalstärke noch auf ihren Background hin unterscheiden. Es konnte lediglich beobachtet werden, daß Hybridisierungen mit der Interferon-α cDNA eine höhere, aber unspezifischere Signalstärke verbunden mit einem höheren Background an Silberkörnchen aufwies. Ein sehr starker Background konnte auch nach Hybridisierung mit cDNA, die durch Oligolabeling markiert war, beobachtet werden. Danach war es unmöglich, die spezifischen Signale noch zu bestimmen. Insbesondere Kontrollen mit H2-K^k cDNA hatten einen sehr starken Background.

3.7.5.2. Expositionszeit

Die Expositionszeiten bei Hybridisierung mit α^{35}S-markierten cDNAs unterteilten sich in eine kurze, d.h. 10-14 Tage, und eine lange, d.h., 18-30 Tage. Bei α^{32}P-markierten cDNAs reichten kurze Expositionszeiten von 8 bis 9 Tagen vollkommen aus, um ein spezifisches Signal zu erhalten. Auf der anderen Seite jedoch reichte eine Expositionszeit von 11-14 Tagen für Hybridisierung mit α^{35}S-markierten cDNAs nicht aus. Teilweise lag die Größe der Kurzzeitsignale deutlich unter der der Langzeitsignale. Die Signalstärke schwankte zwischen zwei bis fünffach niedrigerer Silberkörnchenzahl pro Zelle für die kurze Expositionszeit.

3.7.5.3. cDNA-Menge pro Ansatz und deren spezifische Aktivität

Die DNA-Menge, die pro 10 µl (Ansatz) eingesetzt wurde, lag zwischen 5 ng und 0.5 ng und die Counts zwischen 10^5 cpm und 2×10^6 cpm. Wurden bei einem Vergleich die 10fache Menge des einen, also 5 ng und 0.5 ng eingesetzt, zeigte sich bei Verwendung von Plasmid-DNA zur Hybridisierung, daß sich die spezifischen Signale nicht veränderten, sondern vermittelten eher den Eindruck, daß die kleinere DNA-Menge stärkere Signale erzeugte. Bei Versuchen, bei denen eine hohe Signalstärke erzeugt wurde, zeigte sich, daß zwischen 0,5 und 0,8 ng pro 10 µl Hybridisierungsmix eingesetzt wurde. Bei Versuchen, die ein klares Hybridisierungssignal aufwiesen, lagen die spezifischen Aktivitäten bei 4×10^8 cpm/µg DNA. Bei einer geringeren spezifischen Aktivität verschlechterten sich die Gesamtzahlen an Silberkörnchen. Neben der Expositionszeit spielte vor allem eine ausreichend hohe spezifische Aktivität von mindestens $1\text{-}2 \times 10^8$ cpm pro µg DNA eine wichtige Rolle.

3.7.5.4. Homogenität des Hybridisierungssignals nach Induktion der Zellen

Wurden Zellen spezifisch induziert und ein starkes Hybridisierungssignal erhalten, dann waren nicht alle Zellen gleichzeitig positiv. Auch war die Signalstärke positiver Zellen nicht gleich. Die Anzahl der Silberkörner pro Zelle erstreckte sich über einen weiten Bereich, so daß gleichzeitig stark positive Zellen und negative Zellen in dem gleichen Präparat vorhanden waren. Selbst RNase Kontrollen oder auch nicht induzierte Zellen enthielten unterschiedliche Silberkörnerzahl, wenn sie sich auch in der Bandbreite von 0 bis 20 Silberkörnern bewegte. Bei mikroskopischer Auswertung stark positiver Präparate hatten Zellen, die eine große Zahl an Silberkörnern enthielten, in ihrer direkten Nachbarschaft auch Zellen, die weniger oder fast keine Silberkörner enthielten. Stark positive Zellen waren statistisch über das Präparat verteilt. Eine Ursache dieser unterschiedlichen Induktionsstärke könnte sein, daß Zellen z.B. nur zu einem gewissen Zeitpunkt während des Zellzyklus induzierbar sind.

3.8. Übersicht über die Ergebnisse

Die hier dargestellten Ergebnisse beschreiben das Phänomen der Interferoninduktion in Abhängigkeit vom Induktor. Die Zielzelle stellte der Makrophage dar, der aus Knochenmarkszellen in konditioniertem Medium zu einer reinen Kultur auswächst. Unter diesen kontrollierten Bedingungen, also Zellkulturen ohne Kontamination mit anderen Zelltypen, ließen sich gezielte Induktionsversuche unternehmen. Diese ergaben, daß in Makrophagen meist nur Interferon-ß induziert wurde. Auf der anderen Seite war klar, daß Makrophagen auf Grund ihres monospezifisch induzierten Interferon nur einen Beitrag zum Seruminterferon induzierter Mäuse darstellen. Sehr einfach und schnell ließen sich induzierte Interferone durch Auftrennung ihrer Aktivitäten mit einer CH-Sepharose 4B-Säule in Abhängigkeit vom Induktor unterscheiden. Fast jeder Induktor führte hierbei offensichtlich, ob in vitro oder in vivo, zu einem ganz spezifischen Elutionsprofil und differenzierter Antigenität. Bei der weiteren Charakterisierung der Interferoninduktion wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß sich die Induktionskinetiken von CMA und NDV induzierter Makrophagen wesentlich unterschieden. Die Maxima der Menge an Interferon mRNA lagen bei NDV-Induktion 6 h später als bei CMA-Induktion. Auch hier zeigten gute Hybridisierungssignale mit Interferon-ß cDNA, daß Makrophagen auf Induktion hauptsächlich

Interferon-ß erzeugten. Durch Einsatz der in situ Hybridisierung konnte die spezifische Induktion in der einzelnen Zelle beobachtet werden. Hier stellte sich heraus, daß die Induktion nicht alle Zellen zur Produktion von Interferon mRNA anregte. Es gab graduelle Abstufungen der Interferonantwort, deren Ursache noch aufzuklären ist.

Als weiterer Ansatz zur Aufklärung der Induktionsmechanismen wurde die Fusion von Mauszellen und menschlichen Zellen durchgeführt. Die Frage war, ob CMA in der Lage ist, in Heterokaryonten die menschlichen Kerne zur Interferonproduktion anzuregen, was bei Homokaryonten aus menschlichen Zellen nicht möglich ist. Nach der Fusion wurden nur sehr kleine Titer an Interferon nachgewiesen. Der biologische Test ist wahrscheinlich nicht sensitiv genug, um die Induktion von menschlichem Interferon einzelner Zellen zu erfassen. Als Detektionssystem böte sich die in situ Hybridisierung an, bei der dann die Signale einzelner Heterokaryonten nachgewiesen werden könnten.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden Interferone, von Mausmakrophagen gebildet, charakterisiert. Makrophagen spielen als integrales Element sowohl in humoraler als auch zellvermittelter Immunität eine zentrale Rolle bei der Abwehr von nicht körpereigenen Stoffen. Dazu werden eine Vielzahl von Zytokinen (unspezifische Abwehr) in Makrophagen erzeugt. Zu ihnen gehört auch Interferon, das nicht nur antiproliferativ aktiv ist, sondern als pleiotropes Molekül eine Vielzahl von Aktivitäten aufweist (Lucas und Epstein, 1985; Stewart, 1979).

Makrophagen entwickeln sich aus den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Das Durchlaufen verschiedener Entwicklungsstadien führt schließlich zum differenzierten Makrophagen. Makrophagen werden durch Wachstumsfaktoren oder Transformation mit viraler DNA (Mauel und Defendi, 1971) zur Differenzierung und Teilung angeregt (Guilbert, 1985). Die Differenzierung von Makrophagen aus Knochenmarkszellen erfolgt nur unter Anwesenheit eines spezifischen Wachstumsfaktors. Er wurde als Makrophagen-Zytotoxizitätsfaktor (MCF) bezeichnet (Mehrpohl et al., 1976), der spezifisch Makrophagen aktiviert und zur Familie der Colony stimulating factors (CSF) gehört. Die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor (MCF oder CSF-1) unterliegt einer Feedback-Regulation, bei der Prostaglandine und Interferon-α/ß als Antagonisten wirken (Moore et al., 1984b). Dennoch entstanden immortalisierte Mausknochenmarksmakrophagen entweder durch permanente Stimulation durch endogene Produktion der makrophagenkoloniebildenden Aktivität (Sklar et al., 1985) oder durch Transformation mit viraler DNA.

Makrophagen wurden in konditioniertem Medium, das als Zusatz L-929 Zellüberstand und somit den für Makrophagen spezifischen Wachstumsfaktor enthielt, kultiviert (Fleit und Rabinovitch, 1981b). Dadurch konnte aus Knochenmarkszellen der Maus in vitro nach sieben Tagen vollständig ausdifferenzierte Makrophagen erhalten werden (Havell und Spitalny, 1980). Die Homogenität einer Makrophagenkultur läßt sich durch verschiedene Parameter überprüfen. So charakterisieren biologische Funktionen die Spezifität der Zellpopulation. Die unspezifische Esterasefärbung, die auf der Anwesenheit lysosomaler Enzyme beruht, identifiziert ebenfalls Makrophagen (Koski et al., 1976). Die adhärenten Zellen und die Zellen des Überstands wurden als Zytospinpräparate der Färbung unterzogen. Eine besonders für Makrophagen geeignete Fixierungsmethode brachte keinen Vorteil gegenüber luftgetrockneten Präparaten, die eher noch intensivere Färbung zeigten.

Die esterasepositiven adhärenten Zellen nahmen kontinuierlich über die Zeit zu, bis sie nach sechs bis sieben Tagen etwa 98% der Zellpopulation ausmachten. In den ersten fünf Tagen waren zwischen 16 und 25% der Zellen des Kulturüberstandes esterasepositiv. Nach fünf Tagen wurde routinemäßig das Kulturmedium ausgetauscht. Die Zellen des Überstandes enthielten nach insgesamt sieben Tagen annähernd soviele esterasepositive Zellen wie der Monolayer. Die Zellen des Überstandes ließen sich wieder aussäen und ein Großteil setzte sich und nahm die morphologische Gestalt der Makrophagen an. Die große Zahl der esterasepositiven Zellen im Kulturüberstand und der 98prozentige Anteil im Monolayer entsprach den Ergebnissen, die nach Immunfluoreszenzmarkierung mit dem makrophagenspezifischen monoklonalen Antikörper F4/80 erhalten wurden (R. Zawatzky, pers.Mitteilung). Wahrscheinlich beruhte die große Zahl der lebenden Makrophagen im Überstand auf ihrer ausgeprägten Kontaktinhibition im Monolayer, die eine bestimmte Zelldichte (etwa 6 x 10^6 Zellen in 9 cm-Schalen) nie überschritt. Da die Kulturen ständig stimuliert wurden, befanden sich die Zellen, die nicht adhärieren konnten, im Überstand.

Eine weitere Eigenschaft der Makrophagen ist die Fähigkeit auf Induktion Interferon zu produzieren. Nach viraler Infektion mit Newcastle Disease Virus (NDV) oder Induktion mit Lipopolysaccharid (LPS) und Polyinosyl-polycytidylsäure (PIC) konnten hohe Interferontiter erzeugt werden, die aufgrund von Neutralisationsexperimenten dem Typ I-Interferon zugeordnet wurden (Fleit und Rabinovitch, 1981a). Ein besonders potenter Interferoninduktor, das 10-Carboxymethyl-9-acridanon (CMA) (Kramer et al., 1975, 1981) ist eine synthetische, niedermolekulare Substanz (MW 275). Die Interferon-Induktion mit CMA war ein weiterer Parameter für die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen. Proportional mit dem Anstieg der esterasepositiven Zellen erhöhte sich auch der induzierte Interferontiter, der nach sechs bis sieben Tagen ein Niveau von 900 Einheiten erreichte.

Die Induktion von Makrophagenkulturen mit 10-Carboxymethyl-9-acridanon führte zu hohen Interferontitern im Kulturmedium. Derselbe Induktor konnte in menschlichen Zellen kein im biologischen Test nachweisbares Interferon erzeugen. Gibt es bei der Makrophageninduktion eine Aktivität, die den Menschzellen fehlt, und sie dadurch nicht in der Lage sind, Interferon auf CMA-Induktion zu produzieren? Enoch et al. (1986) konnten einen Faktor zur Aktivierung des menschlichen Interferon-β Gens nachweisen. Dieser Interferon-induzierende Faktor wurde nach Induktion erzeugt. Durch Fusion wurden Heterokaryonten

erzeugt, die nach PIC-Induktion 20mal mehr menschliches Interferon-ß produzierten als nicht fusionierte menschliche Zellkulturen. Der in Mauszellen erzeugte transaktivierende Faktor konnte als ein Element identifiziert werden, das durch Inaktivierung eines Repressors die Interferoninduktion in menschlichen Zellen ermöglichte (Goodburn et al., 1986). Der entscheidende Unterschied zwischen der Induktion mit PIC und CMA in menschlichen Zellen ist, daß CMA kein Interferon aber PIC immerhin etwas Interferon induzierte. Somit war die potentielle Möglichkeit der Interferoninduktion vorhanden.

Die Erzeugung von Heterokaryonten aus Mausmakrophagen und menschlichen Fibroblasten (BUD-8 Zellen) und anschließende CMA-Induktion sollte, wenn auch in diesem Fall durch ein in Makrophagen erzeugtes transduzierendes Element gefunden würde, also menschliches Interferon induziert würde, Aufschlüsse über Induktionsmechanismen ergeben. Die für Makrophagen- und BUD-8 Zellkulturen bestmögliche Bedingungen von Heterokaryonten ergaben sich durch Einsatz des Fusionsmediums I und durch Reduktion der Fusionszeit von 90 sec, wie normalerweise bei Fusionen verwendet, auf 60 sec. Enoch et al. (1985) beschrieben, daß 30-60 Prozent der menschlichen Kerne in Heterokaryonten gefunden wurden. Bei der Makrophagen/BUD-8-Fusion gab es nur etwa 1% Heterokaryonten. Da aber nur etwa 5% aller Zellen menschliche BUD-8 Zellen waren, entspricht das einer Fusionsrate von Maus-Menschzellen von 20%. Der Grund für die niedrige Anzahl an BUD-8-Zellen könnte, obwohl theoretisch 25% menschliche Zellen in der Gesamtkultur vorhanden sein sollten, in einer geringeren Plattierungseffizienz der BUD-8 Zellen liegen. Im Überstand von CMA induzierten Mischkulturen konnten sehr kleine Interferontiter zwei Tagen nach Fusion nachgewiesen werden. Ob dieses tatsächlich in Heterokaryonten erzeugte Interferon darstellte oder ob es kreuzreaktive Aktivitäten waren, ließ sich nicht schlüssig sagen, da in den CMA induzierten Mischkulturen sehr viel Maus-Interferon nachgewiesen wurde. Ein weiteres Problem stellte die von Enoch et al. (1986) mit Hilfe der in situ Hybridisierung gemachte Beobachtung dar, daß nur etwa 10% aller Heterokaryonten das Interferon-ß Gen exprimierten. Deswegen erscheint es höchst unwahrscheinlich, daß bei einem Prozent Heterokaryonten menschliches Interferon im Überstand nachweisbar ist. Prinzipiell läßt sich sagen, daß durch Verwendung des Fusionsmedium I und durch die Verkürzung der Inkubationszeit auf 45 sec gute Voraussetzungen für die Bildung von Heterokaryonten geschaffen wurden. Die Zeitpunkte der Induktion, nach 24 h bzw. 48 h, schienen auch geeignet, da Enoch et al. (1986) in diesem Zeitraum die Genexpression von Interferon-ß nach-

weisen konnte. Besser ließe sich die Fusion gestalten, könnte die Plattierungseffizienz der BUD-8 Zellen erhöht werden. In Frage gestellt werden muß, ob die Sensitivität des biologischen Interferontests ausreicht, um Interferoninduktion in Heterokaryonten mit CMA nachzuweisen, wenn die Genexpression in Heterokaryonten so niedrig wie oben beschrieben ist.

Interferone sind Proteine mit hydrophoben Eigenschaften und weisen einen unterschiedlich großen Zuckeranteil auf. Diese Charakteristika ermöglichten es, Interferone von anderen Proteinen abzutrennen, aber auch die Trennung unterschiedlicher Interferonaktivitäten war dadurch gegeben. Die Verwendung von Säulenmaterialien mit kovalent gebundenen hydrophoben Kohlenwasserstoffverbindungen führte dabei zum Erfolg. Ursprünglich wurden Phenyl-Sepharose CH-4B-Säulen zur Reinigung von Kulturüberständen eingesetzt. Das führte zu einer bis zu 60000fachen Anreicherung (Bousquet-Ucla et al., 1979). Auch hydrophobe Proteine wie BSA oder niedermolekulare Substanzen wie Carboxypentylreste führten, an Matrices gekoppelt, zur Anreicherung um das 2000fache (Davey et al., 1976). Die Auftrennung und Elution durch erhöhte Ionenstärke über diese Säulen wies auf eine beträchtliche Heterogenität der Interferone hin. Wietzerbin et al. (1979) versuchten, in Makrophagen induziertes Interferon aufzutrennen und über seine antigenen oder molekularen Eigenschaften zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wurden dazu CH-Sepharose 4B-Säulen, wie bei Davey et al. (1980) beschrieben, verwendet. Die Induktion von Interferon erfolgte in vitro, also in Makrophagenkulturen als auch in vivo, im Serum von Mäusen. Zuerst wurden die Elutionsprofile und dann die Neutralisation der Aktivitätsspitzen induzierter Interferone miteinander verglichen. Als Induktoren fanden 10-Carboxymethyl-9-acridanon (CMA), Polyinosyl-polycytidylsäure (PIC) und Newcastle Disease Virus (NDV) Anwendung. Die Auftrennung von in Makrophagen mit CMA und PIC induzierten Interferone ergab jeweils zwei, die mit NDV induzierten Interferone jedoch drei Aktivitätsspitzen. Beide Aktivitäten, nach PIC-und CMA-Induktion und die letzten zwei Aktivitäten nach NDV Induktion, konnten mit Antikörper gegen Interferon-ß neutralisiert werden. Die erste Aktivitätsspitze NDV induzierter Interferone wurde von einem Gemisch aus Antikörper gegen Interferon-α und -ß neutralisiert, wobei mit Antikörper gegen Interferon-α nur ein Bruchteil davon neutralisiert werden konnte. Fleit und Rabinovitch (1981a) konnten ihre mit PIC und NDV induzierten Aktivitäten vollständig mit Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisieren. Das widerspricht unseren Ergebnissen insofern, daß nach NDV-Induktion ein Minimalanteil von Interferon-α nachgewiesen werden

konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß NDV induzierte Makrophageninterferone, wenn über die PAGE aufgetrennt, auch einen geringen Anteil an Interferon-α Aktivität aufwies. Machida et al. (1984) fanden in L-Zellen nach PIC-Induktion hauptsächlich Interferon-ß.

Die erste Aktivitätsspitze von CMA und PIC induzierter Aktivitäten konnte nach Auftragen auf die CH-Sepharose 4B-Säule im Durchfluß nachgewiesen werden, die nach CMA-Induktion 80% und nach PIC-Induktion 45% der eluierten Aktivitäten ausmachten. Dennoch unterschied sich das Elutionsverhalten dadurch, daß die Restaktivitäten nach CMA-Induktion erst unter Hochsalzbedingungen (1,5 M NaCl) bei PIC-Induktion schon nach dem pH-Anstieg eluierten. Die Elution NDV induzierter Aktivitäten erfolgte mit 36% im Durchfluß, 20% nach pH-Anstieg und 44% unter Hochsalzbedingungen. Ein ähnliches Elutionsverhalten konnten auch Maehera et al. (1977) zeigen, die NDV-induziertes Interferon in Peritonealmakrophagen über eine CH-Sepharose 4B-Säule auftrennten. Dabei eluierten 10% der Aktivitäten im Durchlauf, 20% nach pH-Anstieg und 70% unter Hochsalzbedingungen. Davey et al. (1976) führten die Elution NDV-induzierter Interferone in L-Zellen durch und erhielten 60% der eluierten Aktivitäten nach Anstieg des pH-Werts und die restlichen 40% unter Hochsalzbedingungen wieder.

Bei unseren Experimenten führte die Elution der Interferonaktivitäten aus Mausseren nach Induktion mit PIC (4 h), NDV (3 h) und NDV (8 h) zu jeweils drei Aktivitätsspitzen, repräsentiert, wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen, während jeder Elutionsbedingung der CH-Sepharose 4B Säule. Alle eluierten Aktivitäten wurden mit Antikörper gegen Interferon-α und Interferon-ß neutralisiert. Jede Aktivitätsspitze erschien als Gemisch beider Subtypen. So verteilten sich die PIC-induzierten Aktivitäten mit 90, 2 und 8% auf die drei Elutionsbedingungen. Bei CMA eluierten in vivo induzierte Interferonaktivitäten zu 71% im Durchlauf, 13% nach Anstieg des pH-Werts und 16% unter Hochsalzbedingungen. Aber alle Aktivitätsspitzen wurden im Gegensatz zu mit PIC und NDV induzierten Aktivitäten allein mit Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisiert.

DeMaeyer-Guignard et al. beschrieben das durch NDV induzierte "early" (3 h) Interferon und "late" (8 h) Interferon, produziert von stahlenresistenten bzw. strahlensensitiven Zellen. In meinen Versuchen zeigte das Elutionsprofil von NDV induzierten Seruminterferon 3 h und 8 h nach Induktion ebenfalls drei Aktivitätsspitzen. Jedoch enthielt die erste Aktivitätsspitze des 8 h Interferons fast zwei Drittel der eluierten Gesamtaktivität, während die drei Aktivitäten des 3 h Interferons etwa gleich groß waren. Dieses Resultat könnte ein weiterer

Beweispunkt für die Schlußfolgerung von DeMaeyer-Guignard (1986) sein, daß unterschiedliche Zellpopulationen an der Interferonproduktion beteiligt sind.

Bousquet-Ucla et al. (1980) berichteten, daß bei der Elution von einer Phenylsepharose-Säule alle Aktivitäten, sowohl von Brucella abortus (einem Bakterium) induziertem Interferon als auch mit NDV im Serum von Mäusen induziertem Interferon, im Durchfluß eluierten. Die Autoren waren der Ansicht, daß Rohüberstände - sie erzielten mit teilgereinigtem Interferon eine spätere Elution - sich nicht auf Grund hydrophober Wechselwirkung trennen ließen, was jedoch anderweitig gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben, daß in Abhängigkeit von den Induktoren charakteristiche Elutionsprofile der Interferonaktivitäten auftraten.

Als weiteres Kriterium wurde die Bestimmung des Molekulargewichts induzierter Interferone eingeführt. Interferon wurde über PAGE aufgetrennt, anhand von Eichkurven die Molekulargewichte und durch Neutralisation mit Antikörpern die Antigenität definiert. Die in vitro Induktion ergab ein einheitliches Bild. In den Makrophagen wurde mit allen drei Induktoren hauptsächlich Interferon-ß erzeugt, das sich in zwei unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen manifestierte, der kleinere zwischen 25 000 bis 30 000 d und der größere im Bereich von 32 000 bis 40 000 d. CMA induzierte Makrophagen produzierten zwei Interferon-ß Aktivitäten mit 30 000 und 39 000 d, wobei sich in der zweiten 75% der eluierten Aktivität konzentrierte. Die durch PIC induzierten Interferone befanden sich im Bereich von 26 000 und 40 000 d, wobei die Verteilung genau invers zu den mit CMA induzierten Interferonen war.

Ähnliche Ergebnisse erhielt Trapman (1980) mit PIC induzierten L-929 Zellen. Er erhielt nach Auftrennung über PAGE zwei molekular unterschiedliche Spezies, eine im Bereich von 22 000 d und die andere bei 38 000 d. Durch Neutralisation konnte er zwar die Aktivitäten beider Spezies reduzieren, wenn auch unterschiedlich stark. Er war der Ansicht, daß beide Spezies wahrscheinlich dem gleichen Subtyp zuzuordnen sind, sich aber hinsichtlich ihres Glykosylierungsgrades unterscheiden. Yamamoto und Kawade (1980) konnten in L-Zellen nach PIC Induktion zwei Spezies von gleicher Antigenität identifizieren, die wohl gewisse Ähnlichkeiten bezüglich ihrer Antigenität mit NDV-induzierten Interferonen in C243-Zellen (Fibroblastenzellinie) aufwiesen.

Induzierten wir Makrophagen mit NDV, so konnten wie bei CMA und PIC-Induktion zwei Spezies von Interferon-ß bei 25 000 d und 32 000 d erzeugt werden, die etwa 93% der eluierten Gesamtaktivität ausmachten. Die restlichen 7%

jedoch hatten ein Molekulargewicht von 18 000 d und wurden mit Antikörpern gegen Interferon-α neutralisiert. Yamamoto (1980) konnte dagegen nur zwei Spezies von 24 000 d und 36 000 d in L-Zellen mit NDV erzeugen, die nach Neutralisation der Aktivitäten unterschiedlichen Interferon-Subtypen zugeordnet wurden. Auch nach NDV-Induktion von C243-Zellen konnte er nur zwei Aktivitäten mit Molekulargewichten von 22 000 d und 35 000 d nachweisen. Bei der größeren Komponente konnten nach Färbung mit Perjodsäure-Schiffscher Base Zuckeranteile nachgewiesen werden (DeMaeyer-Guignard et al., 1978). Stewart (1974) trennte Interferon aus induzierten L929-Zellen in zwei molekular unterschiedlichen Spezies auf, die Molekulargewichte von 22 000 d (etwa 90% der eluierten Aktivität) und 38 000 d (mit 10% der Aktivität) aufwiesen.

Dem gegenüber stehen Induktionsversuche von Kawade et al. (1982), der in C243-Zellen drei molekular unterschiedliche Spezies nachweisen konnte, die Molekulargewichte von 18 000 d, 24 000 d und 30 000 d besaßen. In allen Fällen konnte die kleinste Komponente mit Antikörper gegen Interferon-α und die zwei anderen mit Antikörpern gegen Interferon-ß neutralisiert werden.

Cabrer et al. (1979) und Taira et al. (1980) erhielten ähnliche Ergebnisse nach NDV-Induktion von Ehrlich Aszites Tumorzellen, wobei hier die Molekulargewichte bei 20 000 d, 26 000 d und 33 000 d lagen. Die Antigenität der Spezies entsprach der bei Kawade et al. (1982) beschriebenen. Die Sequenz der ersten 24 Aminosäuren waren für die 26 000 d und 33 000 d Anteile gleich. Die Autoren nahmen an, daß unterschiedliche Glykosylierungsgrade die molekularen Unterschiede verursachten. Die Molekulargewichte von Interferon aus C243-Zellen und EAT-Zellen korrelierten gut mit den Induktionsverhältnissen NDV behandelter Makrophagen.

Die in vivo Induktion mit CMA ergab ebenfalls nur Interferon-ß im Verhältnis von 40 zu 60% für Aktivitäten im Molekulargewichtsbereichen von 25 500 d und 38 500 d. Bei der in vivo Induktion mit PIC und NDV konnten dagegen beide Interferonsubtypen nachgewiesen werden. Darüberhinaus änderte sich in Abhängigkeit von der Induktionszeit die Antigenität und prozentuale Verteilung der Seruminterferone. Im Serum von PIC induzierten Mäusen konnte nach 4 h neben einem Hauptanteil an Interferon-α mit einem Molekulargewicht von 19 000 d noch 20% Interferon-ß mit einem Molekulargewicht von 27 000 d nachgewiesen werden. Wurden Mäuse 8 h mit PIC induziert, so wurde nur noch Interferon-α nachgewiesen, das mit den Ergebnissen von Machida et al. (1984) übereinstimmte, die nach acht bis 24 h ebenfalls nur noch Interferon-α im Serum fanden.

Die Dauer der Interferoninduktion in vivo mit NDV spielte eine wichtige Rolle. DeMaeyer-Guignard et al. (1983) zeigten zwei Aktivitätsspitzen an Serum-interferon, das "frühe" Interferon (2 bis 3 h nach Induktion) und das "späte" Interferon (6 bis 9 h nach Induktion). Der Unterschied beruhte auf der Tatsache, daß nach Bestrahlung der Tiere nur "spätes" Interferon produziert wurde, während ohne Bestrahlung auch "frühes" Interferon auftrat. "Spätes" Interferon ist ein Produkt strahlensensitiver Zellen und "frühes" Interferon strahlenresistenter Zellen und weist auf unterschiedliche Zellpopulationen hin, die in der Synthese von frühem bzw. spätem Interferon beteiligt sind. Bei der Charakterisierung dieser Interferone fanden wir 3 h nach NDV-Induktion im Serum gleiche Anteile an Interferon-α und Interferon-β mit einem Molekulargewicht von 18 000 d und 26 000 d. 8 h nach Induktion konnten 80% Interferon-α mit einem Molekulargewicht von 19 000 d und 20% Interferon-β mit Molekulargewichten von 27 000 d und 38 000 d nachgewiesen werden. Das zusätzlich auftretende Molekulargewicht bei 38 000 d im 8 h Seruminterferon und die unterschiedliche Verteilung der Interferonsubtypen-α und -β in 3 und 8 h Seruminterferon könnten ein weiterer Hinweis für den unterschiedlichen Ursprung des frühen und späten Interferons sein.

Gut korrelierten auch die Verteilungen der Subtypen hinsichtlich der Induktionszeit mit denen von DeMaeyer-Guignard et al. (1986) beschriebenen. Als Hauptkomponenten nach 2 h konnten sie Interferon-β mit 60% und nach 8 h Interferon-α mit 90% nachweisen. Es gab Hinweise, daß die molekularen Unterschiede induzierter Interferon-β-Spezies auf unterschiedlichen Zuckeranteilen beruhten. Die Glykosylierung von Proteinen läuft als posttranslationaler Prozeß ab. Werden gleichzeitig zur Proteinbiosynthese Hemmstoffe wie Tunicamycin beigegeben, so unterbleibt die Glykosylierung der Proteine und infolgedessen verringert sich das Molekulargewicht.

Nichtbehandelte CMA-induzierte Makrophagen erzeugten Interferon mit Molekulargewichten von 30 000 d und 40 000 d. Nach Tunicamycinbehandlung verschwanden beide hochmolekularen Aktivitäten, und es trat eine Interferonaktivität bei 19 000 d auf. Ähnliche Ergebnisse konnten mit PIC induzierten Makrophagen erzielt werden. Watanabe et al. (1983) wiesen den gleichen Effekt mit Sendai Virus induzierten menschlichen Zellen nach. Auch Fujisawa et al. (H) mit NDV induzierten L929-Zellen und Raj und Pitha (1981) mit NDV induzierten C243-Zellen detektierten nach Tunicamycinbehandlung Interferone gleicher Antigenität mit einem Molekulargewicht von 18 000 d. Ähnliche Ergebnisse

konnten Fujisawa und Kawade (1981) auch nach Glykosidasebehandlung erzielen. Bei Abwesenheit des Zuckeranteils war eine erniedrigte Hitzestabilität zu beobachten. Die induzierten Titer an deglykosyliertem Interferon wie auch seine Löslichkeit waren deutlich vermindert. Die Glykosylierung scheint für Interferon-ß im Gegensatz zu Interferon-α essentiel für seine Stabilität und wohl auch für Synthese bzw. Sekretion zu sein.

In Mausmakrophagen wurde hauptsächlich Interferon-ß induziert. Die Induktion in menschlichen Makrophagen hingegen führte zur Produktion des Interferon-α Subtyps. Die in vivo Induktion ergab abgesehen von der CMA-Induktion ein Gemisch beider Subtypen variierend nach der Zeit. Ausgehend von den Verhältnissen auf Proteinebene, das heißt ausschließliche Induktion in vitro von Interferon-ß nach CMA und PIC, nur geringste Mengen an Interferon-α nach NDV Induktion, sollte dann auf m-RNA-Ebene die Regulation der Expression von Interferon-α und -ß sowohl qualitativ wie quantitativ analysiert werden. Als spezifische Proben wurden die cDNA-Klone pMß-3 (Interferon-ß) mit einer Länge von 680 Basenpaaren (Hijashi et al., 1983), pMF 12-04 (Interferon-α) (Kelley et al., 1983) mit der 5'-Region von Interferon-α und einer Größe von 820 bp und der genomische Interferon-α2 Klon (Zwarthoff et al., 1985) mit einer Größe von 2,5 kb eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte immer unter stringenten Bedingungen. Die Induktion von C243-Zellen mit NDV ergab sowohl mit Interferon-α als auch mit der Interferon-ß DNA im Northern Blot ein etwa gleich starkes Signal. Im Kulturüberstand von C243-Zellen waren etwa 80% des Interferons vom Subtyp ß und 20% vom Subtyp α. Der Unterschied zu den RNA Daten könnte auf dem Einsatz unterschiedlicher Mengen an Interferon-α und -ß Proben beruhen. Diese Signalverteilung ermöglichte es, bei der Induktion von m-RNA als Positivkontrolle zu dienen.

Northern Blot Analysen mit 6 h NDV-induzierter Gesamt-RNA sowie mit polyadenylierter RNA aus Makrophagen ergaben ein starkes Signal mit der Interferon-ß Probe. Ein Interferon-α-Signal konnte nicht identifiziert werden. Wurden jedoch große Mengen RNA eingesetzt und lange Zeit exponiert (etwa 20 Tage), konnte nach acht Stunden NDV-Induktion ein schwaches Interferon-α Signal nachgewiesen werden. Kelley et al. (1985b) berichteten, daß in L929-Zellen nach NDV-Induktion Interferon-α verhältnismäßig stark exprimiert wurde, während in PIC induzierten Zellen nur wenig Interferon-α nachgewiesen werden konnte.

Bei Hybridisierungen mit RNA aus CMA, PIC und NDV induzierten Makrophagen ergaben CMA und NDV induzierte mRNA gute Signale mit Interferon-ß cDNA. In RNA-Präparationen aus PIC induzierten Makrophagen konnte nach vierstündiger

Induktion kein Interferon-ß Signal gezeigt werden, obwohl die RNA nicht degradiert war. Restliche PIC mRNA war als Schmier unterhalb 0,5 kb nachweisbar. Möglicherweise war die mRNA in diesem Falle schon wieder abgebaut und nur in so geringem Umfang vorhanden, daß sie unter der Nachweisgrenze lag. Kelley et al. (1985b) und Raj und Pitha (1983) zeigten, daß RNA aus PIC und NDV induzierten Fibroblasten etwa gleichstarke Interferon-ß mRNA Expression zeigten. CMA induzierte Makrophagen mRNA ergab ebenfalls etwa gleichstarke Signale mit Interferon-ß wie nach NDV-Induktion, aber Hybridisierung mit Interferon-α DNA führte zu keinem detektierbaren Signal.

Kinetiken mit CMA- und NDV-induzierten Makrophagen führten zu unterschiedlichen Maxima der mRNA-Expression. So wurde in CMA induzierten Makrophagen nach 2 h die meiste RNA nachgewiesen. Sie nahm über sechs Stunden kontinuierlich ab und war nach 8 h nicht mehr nachweisbar. NDV-Induktion hingegen führte zu einem Maximum nach 8 h. Die mRNA war nach 24 h nicht mehr nachweisbar. 4 h nach Induktion mit NDV konnten bei Hybridisierung mit Interferon-ß die ersten Signale nachgewiesen werden. Kelley und Pitha (1985b) und Raj und Pitha (1983) zeigten, daß NDV induzierte L929-Zellen nach 10 bis 12 h ein Maximum an Interferon mRNA aufwiesen. Die ersten Signale traten nach 4 h auf und waren zwischen 6 und 20 h etwa gleich stark. Die mit PIC induzierten Maus- und Humanfibroblasten produzierten schon nach 3 bis 5 h maximale Mengen an Interferon-ß mRNA mit einer kurzen Halbwertszeit. In den Experimenten fanden wir ebenfalls eine kurze Halbwertszeit für CMA induzierte Interferon mRNA aus Makrophagen mit einem Maximum bereits nach 2 h. Vergleiche von NDV induzierten menschlichen Zellen mit Mausmakrophagen zeigten, daß beide ein späteres Maximum an Transkripten aufwiesen als mit anderen Induktoren. Menschliche Fibroblasten hatten nach 6 bis 10 h und Mausmakrophagen nach etwa 8 h ein Maximum an Transkripten. In beiden Zellinien nahm die spezifische mRNA kontinuierlich ab, bis nach 24 h keine mRNA mehr nachgewiesen werden konnte.

Es gibt Ähnlichkeiten der mRNA und Protein-Daten von CMA- und NDV-induzierten Mausmakrophagen mit denen von PIC- und NDV-induzierten menschlichen Fibroblasten. CMA- und PIC-induzierte Mausmakrophagen erzeugten wie PIC induzierte menschliche Fibroblasten ausschließlich Interferon-ß (Raj und Pitha, 1983). Nach NDV-Induktion konnten neben Interferon-ß in beiden Zellinien auch kleine Mengen an Interferon-α nachgewiesen werden. Raj und Pitha (1983) zeigten, daß in PIC induzierten menschlichen Fibroblasten bei ständiger Anwesenheit von Cycloheximid Interferon-ß mRNA über viele Stunden

akkumulierte. Nach Aufheben des Cycloheximidblocks, die Proteinbiosynthese somit wieder in Gang gesetzt, degradierte die Interferon-ß mRNA innerhalb des bekannten Zeitraums. Diese Indizien wiesen stark auf ein Protein hin, das für die Degradation verantwortlich ist. Außerdem konnten Raj und Pitha (1983) mit Run on Experimenten zeigen, daß, obwohl das Interferon-ß Gen aktiv transkribiert wurde, keine mRNA detektierbar war. Das würde bedeuten, daß das Protein auf posttranskriptioneller Ebene wirkte. Der Grund für die höhere Stabilität der NDV-induzierten mRNA könnte in einer durch das Virus selbst bedingten Inhibierung der Proteinsynthese liegen, wodurch sich die Stabilität labiler zellulärer mRNA erhöhen würde.

Bei der Hybridisierung von mRNA nicht induzierter Makrophagen traten nach längerer Expositionszeit (mehr als 20 Tage) Hybridisierungssignale sowohl mit Interferon-α und Interferon-ß auf, die es bei der Hybridisierung mit Gesamtleber RNA nicht gab. Möglicherweise lag hier eine konstitutive Interferonproduktion vor, deren Ausmaße so gering war, daß sie im biologischen Test nicht nachgewiesen werden konnte. Ihre Ursache könnte in den Kultivierungsbedingungen der Makrophagen liegen. Sie wuchsen in konditioniertem Medium, das als Zusatz einen Wachstumsfaktor für Makrophagen, den "colony stimulating factor" (CSF), enthielt. Moore et al. (1984a) beschrieben, daß CSF-1 in Makrophagen Interferon induzieren kann.

Diese Arbeit zeigt, daß nach zweistündiger CMA-Induktion von Makrophagen die Untersuchungen an induzierten Makrophagen auf mRNA-Ebene die Expression von Interferon-ß mRNA ein Maximum erreichte, die 6 h später nicht mehr nachweisbar war. Bei der NDV-Induktion von Makrophagen gab es ein Interferon-ß mRNA Maximum nach 8 h und einer Nachweisdauer bis zu 24 h. Außerdem konnte nach 6 h NDV-Induktion auch ein schwaches Interferon-α mRNA-Signal nachgewiesen werden. Dieses Signal erklärt auch die geringe Interferon-α Menge in Kulturüberständen NDV-induzierter Makrophagen.

Die Regulation von Makrophageninterferon nach CMA- und NDV-Induktion (wahrscheinlich auch nach PIC-Induktion) liegt sehr wahrscheinlich auf Transkriptionsebene.

Durch die "run-on-Transkription" sollte die Expression nukleärer Interferon mRNA nach NDV und PIC-Induktion gezeigt werden. Zu keinem Zeitpunkt konnten jedoch positive Signale für die Interferon mRNA nach Induktion mit CMA oder NDV nachgewiesen werden. Da nach 2 h CMA-Induktion schon ein Maximum an Transkription auftrat und die ganze Zeit dazwischen punktuell erfaßt wurde,

ließen sich diese negativen Ergebnisse nur auf experimentelle Fehler zurückführen. Die Positivkontrolle (DNA aus Mausleber) und die Negativkontrolle (pGem 1) fielen für nichtinduzierte, CMA- und NDV-induzierte Zellen wie erwartet aus. Konnte mit DNA aus Mausleber und pGem 1 hinsichtlich der Induktion keine Signalunterschiede festgestellt werden, so waren die Signale für H2-K^k-DNA gleich stark für alle Ansätze, reduzieren sich bei αAktin cDNA in Präparationen induzierter Zellen. In Maus-L-Zellen zeigte sich dagegen eine Verstärkung der Expression der H-2 und anderer Gene nach NDV-Induktion, während die Expression des ß-Aktin Gens nicht verändert war.

Die in situ-Hybridisierung wurde von Gall und Pardue (1969) zum Nachweis amplifizierter Gensequenzen eingesetzt. Zawatzky et al. (1985) optimierten die in situ-Hybridisierung unter Einbeziehung methodischer Ergänzungen für die Bedingungen der Interferoninduktion. Die cDNA für Interferon-α (pMF 12-04) und für Interferon-ß (pMß-3) wurden durch Nicktranslation mit α^{35}S- oder α^{32}P-dNTP markiert, wobei eine spezifische Aktivität von 2-4 x 10^8 cpm/µg DNA erreicht wurde. Die Befürchtungen, daß α^{32}P-Markierung zu einer diffusen Radioaktivitätswolke führen könnte, das die quantitative Auswertung (Zählen einzelner Silberkörnchen) verhindern würde, war unbegründet. Als positives Signal wurde etwa das 1,5fache der Anzahl der Silberkörner in induzierten Ansätzen gegenüber Ansätzen aus nicht induzierten sowie aus induzierten Zellen, die vor der Hybridisierung mit RNAse behandelt waren, gewertet. Nichtinduzierte Zellen bzw. RNase behandelte induzierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Induktion der Makrophagen erfolgte mit NDV bzw. CMA. Die beschriebene Konzentration an NDV war ausreichend, um jede Zelle zu infizieren (Zawatzky, pers. Mitteilung). Bei Induktion mit CMA wurde die Fluoreszenz der Makrophagen bestimmt. Durch gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz konnte von einer Induktion aller Zellen ausgegangen werden.

Die Induktion erfolgte in sieben bis zehn Tage alten Makrophagen mit NDV für 2, 6 und 8-9 h. Bei der zweistündigen Induktion mit NDV wurden nach Hybridisierung mit Interferon-α keine im Verhältnis zur RNase-Kontrolle positiven Signale erhalten. Bei der zweistündigen Induktion von C243-Zellen mit NDV konnten zwischen 1 und 2% nach Interferon-α DNA-Hybridisierung und etwa 16% positive Zellen mit zum Teil bis zu 100 Silberkörner pro Zelle nach Interferon-ß Hybridisierung nachgewiesen werden (Zawtazky et al., 1985) Wurde die Hybridisierung nach fünf bis sechsstündiger NDV-Induktion von Makrophagen durchgeführt, konnte für die Hybridisierung mit Interferon-α DNA eine sehr

geringe Induktion von etwa 1% der Zellen nachgewiesen werden. Wurden die für 6 h mit NDV induzierten Zellen mit Interferon-ß DNA hybridisiert, wurde ein deutliches Signal beobachtet, das doppelt so groß wie nach der 2 h Induktion war. Diese Induktionsrate entspricht auch in etwa der Slot-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA, wo eine etwa zwei bis vierfache Induktion spezifischer RNA nachgewiesen wurde. Bei der 8 h Induktion von Makrophagen mit NDV hatten 27% aller Zellen zwei bis dreifach höheres Signal als die Kontrolle. Die starke Induktion entspricht den Slot-Blot und Northern-Blot Analysen, die ebenfalls nach 8 h eine maximale Transkriptionsrate aufwiesen. Bei der Induktion von C243-Zellen mit NDV war nach 5 h ein Maximum positiver Zellen mit Interferon-ß mRNA aufgetreten (Zawatzky et al., 1985), die mehr als 100 Silberkörner enthielten. Nach 8 h schien das Maximum der Induktion überschritten.

Makrophagen wurden für 2, 4 und 6 h mit CMA induziert. Bei der Hybridisierung 2 h mit CMA induzierten Zellen mit Interferon-ß cDNA, ^{32}P markiert, konnte das stärkste Signal nachgewiesen werden. Mehr als 50% aller Zellen zeigten ein zwei bis zehnfach höheres Signal als Kontrollansätze. Dabei enthielten 18% aller Zellen 50 bis 200 Silberkörner, wobei bei nicht induzierten und bei RNase behandelten Zellen 3 bis 5% aller Zellen nur bis zu 20 Silberkörner aufwiesen. Dies korrelierte gut mit Northern Blot Analysen, bei denen nach zweistündiger CMA-Induktion die größte Menge an Interferon mRNA nachgewiesen werden konnte. Die 4 h Induktion mit CMA ergab ein relativ schwaches, aber noch signifikantes Hybridisierungssignal, bei dem etwa 34% aller Zellen ein zwei bis dreifach höheres Signals als die Kontrollen hatten. Im Gegensatz zur 2 h Induktion mit 18% der Zellen mit 50 bis 200 Silberkörnern enthielten hier nur 14% der Zellen 30 bis 50 Silberkörner. Ein hoher Prozentsatz positiver Zellen mit bis zu 200 Silberkörnern war bei 6 h CMA-Induktion vorhanden. Trotzdem wiesen nur 24% aller Zellen ein zwei bis dreifach höheres Signal gegenüber nicht induzierten Zellen auf, weil 6% der Kontrollzellen bis zu 70 Silberkörner enthielten. Bei dieser Induktion lagen sowohl eine hohe spezifische Aktivität als auch hohe Interferontiter vor, womit möglicherweise auch die relativ hohe Prozentzahl an induzierten Zellen mit bis zu 200 Silberkörnern, aber auch die Kontrollen, mit bis zu 70 Silberkörnern pro Zelle, in Einklang gebracht werden konnte. Bei der 6 h CMA-Induktion von Makrophagen korrelierten die mRNA-Daten aus Northern Blots nicht streng mit den in situ-Hybridisierungsergebnissen. Während mit Northern Blot oder Slot Blot-Analysen eine starke Abnahme der spezifischen RNA-Menge festgestellt wurde, bewegten sich die Signale der in situ Experimente bei 4 h

und 6 h Induktion auf gleichem Niveau. Während mit Interferon-ß DNA nach CMA Induktion starke Signale auftraten, konnte zu keinem Zeitpunkt bei Hybridisierung mit Interferon-α DNA positive Signale nachgewiesen werden. Hierbei stimmten die mit Gesamt-RNA erhaltenen Ergebnisse mit denen der in situ Hybridisierung überein.

Während Zawatzky et al. (1985) mit einer Mischung von Interferon-α und -ß DNA einen höheren Prozentsatz an positiven C243-Zellen nachweisen konnte, war dies bei induzierten Makrophagen nicht zu beobachten. Die Veränderungen hinsichtlich der Hybridisierung mit nur einer Probe lag in einer Verschiebung in induzierten wie in nicht induzierten Zellen zu einer höheren Zahl an Silberkörnchen pro Zelle. Ansonsten entsprach die Spezifität der Hybridisierung mit nur einer einzigen Interferonprobe.

Spezifische Signale in induzierten Makrophagen zeigten eine relativ große Heterogenität. Zum Teil enthielten weit über die Hälfte aller Zellen, induzierte und nicht induzierte, gleichviel Silberkörner unabhängig von der Signalstärke. Dieses Phänomen wurde auch von Zawatzky et al. (1985) und Enoch et al. (1986) beschrieben. Enoch et al. (1986) zeigten, daß bei fusionierten Mensch-Maus-Hybriden wie bei nicht fusionierten Zellen nur etwa 10% aller Zellen Interferon-ß mRNA exprimierten, unabhängig ob PIC oder ein Virus als Induktor verwendet wurde. Eine Beobachtung war, daß neben Zellen, die sehr viele Silberkörnchen enthielten, Zellen lagen, in denen erheblich weniger Silberkörnchen gezählt werden konnten. Zum Teil hatten diese Zellen nicht mehr Signale als die dazugehörigen Kontrollen. Zawatzky et al. (1984) zeigten, daß diese Heterogenität der mRNA Expression auf Interferoninduktion nicht mit genetischen Variationen innerhalb der Zellpopulationen zusammenhing. Sie etablierten aus der C243 Stammlinie etwa 30 Subklone, die jedoch identische Titer an Interferon nach Induktion produzierten. Eine Erklärung könnte sein, daß die Interferoninduktion vom Zellzyklus ahbängt und nur während einer bestimmten Zyklusphase möglich ist. Daneben existierten noch andere Möglichkeiten, die eine technische Ursache haben und die Spezifität beeinflussen.

Geringere Signalstärken konnten bei der Verwendung von Gesamtplasmiden erhalten werden. Möglicherweise waren Gesamtplasmide zu groß, um ungehindert in die Zellen zu dringen, die nicht zuvor z.B. einer Proteinase K Behandlung unterworfen waren. Lawrence et al. (1985) zeigten, daß kleine Fragmente von 200 bis 300 Nukleotiden optimal mit Nukleinsäuresequenzen in Zellen und Geweben hybridisieren. Ein anderer Faktor, der die Quantität eines Signals verstärkte,

war die Expositionsdauer. Bei ^{35}S-Hybridisierungen erbrachten nur Expositionszeiten von mehr als 20 Tagen gute Resultate. Bei der ^{32}P-Markierung verringerte sich diese Zeit um die Hälfte. Neben der Expositionszeit spielte vor allem eine ausreichend hohe spezifische Aktivität der jeweiligen Interferon DNA eine wichtige Rolle. Bei einer spezifischen Aktivität von weniger als 1×10^8 cpm/µg DNA verschlechtern sich die Hybridisierungsergebnisse rapide.

Ein Phänomen, das schon bei der Analyse der Gesamt RNA beobachtet wurde, konnte auch bei der in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Selbst in nicht induzierten Kontrollansätzen war ein RNAse-sensitives Signal vorhanden. Der beobachtete Effekt beruhte nicht auf großen Unterschieden zwischen nicht induzierten Zellen und RNase Kontrollen, eher war eine Verringerung des Gesamtsignals in RNase behandelten Zellen zu beobachten. Dieses Phänomen trat auch in induzierten Zellpopulationen auf, in denen die Silberkörnerzahl in nicht induzierten Kontrollansätzen höher lag als in den RNase-Kontrollen induzierter Zellen. Erklären ließe sich dieses RNase sensitive Signal damit, daß selbst nicht induzierte Makrophagen aufgrund des im Kulturmedium vorhandenen "colony stimulating factors", wie von Moore et al. (1984a) beschrieben, geringe Mengen an Interferon produzierten.

Die in situ Hybridisierung von $\alpha^{32}P$-markierter DNA mit Interferon mRNA induzierter Zellen führte zu sehr starken Signalen. Bei der Induktion mit NDV konnten in etwa die gleichen Induktionsverhältnisse wie nach Northern- und Slotblotanalysen erhalten werden, mit der höchsten mRNA Expression nach 8 h. Nach 6 h konnte ein geringeres Hybridisierungssignal mit Interferon-α DNA nachgewiesen werden. Bei der Induktion mit CMA trat die größte Signalstärke der Interferon mRNA-Expression nach 2 h auf, wie auch mit Northern Blots mit Gesamt-RNA gezeigt werden konnte. Die Northern Blot Analysen zeigten eine schnelle Degradation der Interferon-ß mRNA über vier Stunden. Makrophagen besaßen zwei wichtige Aspekte, die Studien zur Interferoninduktion interessant machten. Makrophagen sind ein unverzichtbarer Bestandteil des unspezifischen Abwehrsystems und entsprechen als Primärkultur am ehesten physiologischen Bedingungen.

10-Carboxymethyl-9-acridanon induzierte in vivo und in vitro hohe Titer an Interferon. Makrophagen waren die Zellen, die sich am besten durch CMA induzieren ließen. Auf Induktion erzeugten sie hauptsächlich Interferon-ß. Die hohe und schnelle Interferonantwort der Makrophagen legt die Vermutung nahe, daß sie auch in vivo die Produzentenzellen des Seruminterferons sind. Aber in

vivo erzeugtes Interferon hatte einen zum Teil erheblichen Anteil an Interferon-α. Die Makrophagen konnten demzufolge nicht alleinige Produzentenzelle sein. Der Ursprung des Interferon-α Anteils im Serum bleibt nach diesen Ergebnissen weiterhin unklar.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Interferon-Induktion und -Regulation erfolgten Untersuchungen auf Transkriptionsebene. Sie ergaben, daß auf Proteinebene gefundene, vom Induktor abhängige Interferonsubtypexpression auch auf mRNA-Ebene zu finden war. Deswegen könnte man davon ausgehen, daß die Regulation der Interferoninduktion auf Transkriptionsebene liegt. Ein Schritt zur Aufklärung der Steuerung der Transkription könnte die nach Interferoninduktion von Heterokaryonten aus Mensch- und Mauszellen erzeugte Induktion transaktivierende Aktivitäten sein. Dann wäre nicht nur die Ebene der Regulation, sondern besonders der Mechanismus der Interferoninduktion klarer.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der Arbeit war die qualitative wie quantitative Analyse der in Mausmakrophagen induzierten Interferone. Die Makrophagen entstammten den Zellen des Knochenmarks. Sie proliferierten und differenzierten in vitro unter Einfluß des Makrophagen-spezifischen Wachstumsfaktors "CSF-1" zu einer homogenen Zellpopulation. Die in vitro in Makrophagen und in vivo im Serum von Tieren induzierten Interferone wurden nach biochemischen, immunologischen und molekularbiologischen Gesichtspunkten charakterisiert.

Nach Induktion mit 10-Carboxymethyl-9-Acridanon (CMA) und Polyinosylpolycytidylsäure (PIC) erzeugten Makrophagen Interferon-ß. CMA-induziertes Interferon hatte Molakulargewichte von 30 000 d und 39 000 d und PIC-induziertes Interferon von 26 000 d und 40 000 d. Nach Tunicamycinbehandlung reduzierten sich die Molekulargewichte sowohl CMA- wie PIC-induzierter Interferone. Die Proteine unterschieden sich nur hinsichtlich ihres Glykosylierungsgrades.
Bei der Induktion von Interferon mit Newcastle Disease Virus (NDV) traten drei Aktivitäten auf. Die Molekulargewichte von 25 000 d und 32 000 d konnten dem Interferon-ß Subtyp zugeordnet werden. Die Restaktivitäten (etwa 7%) akkumulierten im Molekulargewichtsbereich von 18 000 d und waren vom Subtyp α.
Ein Vergleich mit in vivo induzierten Interferonen sollte klären, ob Makrophagen die alleinigen Produzentenzellen des Seruminterferons sind. Mit CMA-induzierte Interferone im Serum hatten Molekulargewichte von 25 000 d und 38 000 d und waren vom Subtyp ß. In diesem Fall könnten Makrophagen die ausschließlichen Produzentenzellen des Seruminterferons sein. Bei PIC- und NDV-induzierten Interferonen war sowohl Interferon-α wie Interferon-ß im Serum nachweisbar. Die Interferon-α Aktivitäten hatten ein Molekulargewicht von 18-19 000 d. Bei PIC-induziertem Interferon war noch eine 27 000 d Aktivität nachweisbar. Nach längerer Induktionszeit (8 bis 24 h) war im Serum nur noch Interferon-α nachweisbar. NDV-induzierte Seruminterferone des Subtyps ß hatten nach 3 h Aktivitäten mit einem Molekulargewicht von 26 000 d und nach 8 h neben einer 26 000 d noch eine 38 000 d Komponente. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß neben Makrophagen noch weitere Zellpopulationen, deren Identität noch zu bestimmen ist, an der Interferonproduktion in vivo beteiligt sind.

Um den Verlauf der Interferoninduktion und deren Regulation zu charakterisieren, wurden RNA-Präparationen aus induzierten Makrophagen analysiert. CMA-induzierte Makrophagen erzeugten nach 2 h die größte Menge an Inter-

feron-ß mRNA. Nach 8 h war keine mRNA mehr nachweisbar. NDV-induzierte Makrophagen produzierten erst nach 8 h die größte Menge an Interferon-ß mRNA, die nach 24 h nicht mehr nachweisbar war. Parallel zur Maximalproduktion von Interferon-ß mRNA konnten auch geringe Mengen an Interferon-α mRNA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Interferoninduktion auf Proteinebene korrelierten gut mit denen auf mRNA-Ebene, sodaß davon ausgegangen werden muß, daß die Regulation der Interferoninduktion im Verlauf der Transkription stattfindet.

Der Nachweis von Interferon mRNA auf Einzelzellebene mit Hilfe der in situ Hybridisierung bestätigte die Ergebnisse der Gesamt RNA-Präparationen. Die Einzelzelldetektion der Interferon mRNA zeigte, daß die Produktion an mRNA nicht auf alle Zellen gleichmäßig verteilt war. Neben Zellen, über denen eine große Zahl an Hybridisierungssignalen lag, gab es Zellen, die nicht oder nur wenig induziert waren. Die unterschiedliche Induktion der Zellen hängt wahrscheinlich unter anderem vom Zellzyklus, ab. In nichtinduzierten Makrophagen konnte nach Hybridisierung im Verhältnis zu RNase behandelten Zellen ein RNase sensitives Signal gezeigt werden. Dieses Signal beruht möglicherweise auf einer ständigen im biologischen Test nicht nachweisbaren Interferonproduktion, bedingt durch die Kultivierung der Zellen mit "colony stimulating factor 1".

Zur besseren Charakterisierung des Induktionsmechanismus in Zellen wurden Heterokaryonten aus Maus- und Menschzellen mit CMA induziert und auf menschliches Interferon ausgetestet. Menschliche Zellen allein waren nicht in der Lage, auf CMA-Induktion Interferon zu erzeugen. Der biologische Test schien nicht empfindlich genug zu sein, um die geringen Mengen an gebildetem Interferon nachzuweisen. Durch Einsatz der in situ Hybridisierung als Nachweissystem von in Heterokaryonten erzeugter Interferon mRNA könnte die Existenz von Interferon und den gebildeten Interferonsubtyp in den einzelnen Fusionaten nachgewiesen werden.

Kenntnisse der Mechanismen der Interferoninduktion und Regulation würde zum Verständnis der Expression induzierbarer Gene führen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Allen G & Fantes KH
A family of structural genes for human lymphoblastoid (leukocyte-type) interferon.
Nature 287, 408-411, 1980

Alton K; Stabinsky Y; Richards R; Ferguson B; Goldstein L; Altrock B; Miller L & Stebbing N
Production, characterization and biological effects of recombinant DNA derived human IFN-α and IFN-γ analogs.
The Biology of the Interferon System, E. De Maeyer and H. Schellekens eds. 119-128, 1983

Appleyard RK
Segregation of new lysogenic strain derived from Escherichia coli K12.
Gen. 39, 440, 1954

Arnold B; Burgert H-G; Archibald AL & Kvist S
Complete nucleotide sequence of the murine H-2K^k gene. Comparison of three H-2K locus alleles.
Nuc. Acid. Res. 12 (24), 9473-9486, 1984

Balkwill FR; Griffin DB; Band HA & Beverley PCL
Immune human lymphocytes produce and acid-labile α-interferon.
J. Exp. Med. 157, 1059-1063, 1983

Birnboim HC & Doly J
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acid Res. 7, 1513-1523, 1979

Blau HM; Chin C-P & Webster C
Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterokaryons.
Cell 32, 117-1180, 1983

Bolivar F; Rodriguez RL; Greene PJ; Betlach MC; Heyneker HL; Boyer HW; Crosa JH & Falkow S
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2, 95-113, 1977

Bourgeade MF; Rousset S; Paulin D & Chany C
Reorganization of the cytoskeleton by interferon in MSV-transformed cells.
J. Interf. Res. 1 (2), 323-332, 1981

Bousquet-Ucla C; Wietzerbin J & Falcoff E
Studies on brucella interferon; chromatographic behaviour and purification.
Arch. Virol. 63, 57-68, 1980

Brahic M & Haase AT
Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (12), 6125-6129, 1978

Branca AA & Baglioni C
Evidence that types I and II interferons have different receptors.
Nature 294, 768-770, 1981

Brehm G & Kirchner H
Analysis of the interferons induced in mice in vivo and in macrophages in vitro by newcastle disease virus and by polyinosinic-polycytidylic acid.
J. Interf. Res. 6, 21-28, 1986

Brehm G; Storch E & Kirchner H
Characterization of interferon induced murine macrophage cultures by 10-carboxymethyl-9-acridanone.
Nat. Immun. Cell Growth Regul. 5, 50-59, 1986

Brehm G; Storch E & Kirchner H
Antigenicity of interferons induced by different agents.
The Biology of the Interferon System 1984; H. Kirchner and H. Schellekens, eds., 287-290, 1984

Cabrer B; Taira H; Broeze RJ; Kempe TD; Williams K; Slattery E; Konigsberg WH & Lengyel P
Structural characteristics of interferons from mouse ehrlich ascites tumor cells.
J. Biol. Chem. 254 (10), 3681-3684, 1979

Capon DJ; Shepard HM & Goeddel DV
Two distinct families of human and bovine interferon-α genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides.
Mol. Cell. Biol. 5 (4), 768-779, 1985

Cheley S & Anderson R
A reproducible microanalytical method for the detection of specific RNA sequences by dot-blot hybridization.
Analyt. Biochem. 137, 15-19, 1984

Chernyakhovskaya I & Slavina E
Lymphocyte activation by interferon.
Vopr. Virusol. 4, 329-333, 1972

Chirgwin JM ; Przybyla AE; MacDonald RJ & Rutter WJ
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochem. 18, 5294-5299, 1979

Colby C & Duesberg PH
Double stranded RNA in vaccinia virus infected cells.
Nature 222, 940-944, 1969

Daugherty B; Martin-Zanca D; Kelder B; Collier K; Seamans TC; Hotta K & Pestka S
Isolation and bacterial expression of a murine alpha leukocyte interferon gene.
J. Interf. Res. 4 (4), 635-643, 1984

Davey MW; Sulkowski E & Carter WA
Purification and characterization of mouse interferon with novel affinity sorbents.
J. Virol. 17 (2), 439-445, 1976

Derynck R; Content J; DeClercq E; Volckaert G; Tavernier J; Devos R & Fiers W
Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene.
Nature 285, 542-547, 1980

DeMaeyer-Guignard J; Dandoy F; Bailey DW & DeMaeyer E
Interferon structural genes do not participate in quantitative regulation of interferon production by If loci as shown in C57/BL6 mice that are congenic with BALB/c mice at the alpha interferon gene cluster.
J. Virol. 58 (1), 743-747, 1986

DeMaeyer-Guignard J; Tovey MG; Gresser I & DeMaeyer E
Purification of mouse interferon by sequential affinity chromatography on poly(U)- and antibody-agarose columns.
Nature 271, 622-625, 1978

DeMaeyer-Guignard J; Zawatzky R; Dandoy F & DeMaeyer E
An x-linked locus influences early serum interferon levels in the mouse.
J. Interf. Res. 3 (2), 241-252, 1983

Dion M; Vodjdani G & Doly J
Sequence and expression of a novel murine interferon alpha gene - homology with enhancer elements in the regulatory region of the gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 138 (2), 826-834, 1986

Edelman R & Wheelock EF
Vesicular stomatitis replication in human leukocyte cultures: enhancement by phytohemagglutination.
Science 154, 1053-1055, 1966

Enoch T; Zinn K & Maniatis T
Activation of the human ß-interferon gene requires and interferon-inducible factor.
Mol. Cell. Biol. 6 (3), 801-810, 1986

Evinger M; Maeda S & Pestka S
Recombinant human leukocyte interferon produced in bacteria has antiproliferative activity.
J. Biol. Chem. 256 (5), 2113-2114, 1981

Eyster ME; Goeddert JJ; Poon M & Prebble OT
Acid-labile alpha interferon. A possible preclinical marker for the acquired immunodeficiency syndrome in hemophilia.
N. Eng. J. Med. 309 (10), 583-586, 1983

Feinberg AP & Vogelsang B
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Analyt. Biochem. 136, 6-13, 1983

Feinberg AP & Vogelsang B
Addendum
'A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity'.
Analyt. Biochem. 137, 266-267, 1984

Field AK; Tytell AA; Lampson GP & Hilleman MR
Inducers of interferon and host resistance. II Multistranded synthetic polynucleotide complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1004-1009, 1967

Fiers W; Devos R; Cheroutre H; Degrave W; Duerinck F; Gheysen D; Plaetinck G; Remaut E; Scahill S; Simons G; Stanssens P; Tavernier J & van der Heyden J
Molecular-biological sudies on human fibroblast interferon immune interferon and interleukin 2 genes.
The Biology of the Interferon System, E DeMaeyer and H Schellekens, eds., 2-8, 1983

Finter NB
Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays.
J. Gen. Virol. 5, 419-425, 1969

Fleit HB & Rabinovitch M
Production of interferon by in vitro derived bone marrow macrophages.
Cell. Immunol. 57, 495-504, 1981a

Fleit HB & Rabinovitch M
Interferon induction in marrow-derived macrophages: regulation by L cell conditioned medium.
J. Cell. Physiol. 108, 347-352, 1981b

Fujisawa J; Iwakura Y & Kawade Y
Nonglycosylated mouse L cell interferon produced by the action of tunicamycin.
J. Biol. Chem. 253 (24), 8677-8679, 1978

Fujisawa J & Kawade Y
Properties of nonglycosylated and glycosidase treated mouse L cell interferon.
Virology 112, 480-487, 1981

Fujita T; Ohno S; Yasumitsu H & Taniguchi T
Delimination and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon-beta gene.
Cell 41 (2), 489-496, 1985

Fulton F & Armitage P
Surviving tissue suspensions for influenza virus titration.
J. Hyg. Camb. 49, 247-262, 1951

Gall JG & Pardue ML
Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 378-383, 1969

Gisler RM; Lindahl P & Gresser I
Effects of interferon on antibody synthesis in vitro.
J. Immunol. 113 (2), 438-444, 1974

Goeddel DV; Leung DW; Dull TJ; Gross M; Lawn PM; McCandliss R; Seeburg PH; Ullrich A; Yelverton E & Gray PW
The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs.
Nature 290, 411-416, 1981

Goeddel DV; Yelverton E; Ullrich A; Heyneker HL; Miozzari G; Holmes W; Seeburg PH; Dull T; May L; Stebbing N; Crea R; Maeda S; McCandliss R; Sloma A; Tabor JM; Gross M; Familletti PC & Pestka S
Human leukocyte interferon produced by E. coli is biologically active.
Nature 287, 411-416, 1980

Goodbourn S; Burstein H & Maniatis T
The human beta-interferon gene enhancer is under negative control.
Cell 45 (4), 601-610, 1986

Goodbourn S; Zinn K & Maniatis T
Human beta-interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element.
Cell 41 (2), 509-520, 1985

Goren T; Fischer DG & Rubinstein M
Human monocytes and lymphocytes produce different mixtures of α-interferon subtypes.
J. Interf. Res. 6, 323-329, 1986

Gray PW & Goeddel DV
Structure of the human immune interferon gene.
Nature 298, 859-863, 1982

Gray PW & Goeddel DV
Cloning and expression of murine immune interferon cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5842-5846, 1983

Gray PW; Leung DW; Pennica D; Ylverton W; Njarian R; Simonsen CC; Derynck R; Sherwood PJ; Wallace DM; Berger SL; Levinson AD & Goeddel DV
Expression of human immune interferon cDNA in E. coli and monkey cells.
Nature 295, 503-508, 1982

Greenberg ME & Ziff EB
Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos protooncogene.
Nature 311, 433-438, 1984

Gribaudo G; Cofano F; Negro-Ponzi A & Landolfo S
Mouse gamma interferon produced by a cloned T-cell lymphoma. I. Purification and physicochemical characterization.
J. Interf. Res 4 (1), 91-99, 1984

Groudine M; Peretz M & Weintraub H
Transcriptional regulation of hemoglobin switching in chicken embryogenesis.
Mol. Cell. Biol. 1 (3), 281-288, 1981

Guilbert LJ
Mononuclear phagocyte progenitors and growth factors.
Mononuclear Phagocytes
Characteristics, Physiology and Function; R v Furth, ed., Martinus Nijhoff Publ., 243-254

Haase A; Brahic M; Stowring L & Blum H
Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization.
Meth. Enzymol. VII, 198-226, 1984

Hanahan D
Techniques for transformation of E. coli.
In: DNA cloning Vol. 1; a practical approach; DM Glover, ed., IRL Press Washington DC, 1985

Hansen JN
Electrophoresis of ribonucleic acid on a polyacrylamide gel which contains disulfide cross-linkages.
Anal. Biochem. 76, 37-44, 1976.

Havell EA; Hayes TG & Vilcek J
Synthesis of two distinct interferons by human fibroblasts.
Virology 89, 330-334, 1978

Havell EA & Spitalny GL
The induction and characterization of interferon from pure cultures of murine macrophages.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 350, 413-421, 1980

Havell EA; Yip YJ & Vilcek J
Characteristics of human lymphoblastoid (namalva) interferon.
J. Gen. Virol. 38, 51-59, 1977

Helfman DM; Feramisco JR; Fiddes JC; Thomas GP & Hughes SH
Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of cDNA expression library.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 31-35, 1983

Henco K; Brosius J; Fujisawa A; Haynes JR; Hochstadt J; Kovacic T; Pasek M; Schamboeck A; Schmid J; Todokoro H; Waelchli M; Nagata S & Weissmann C
Structural relationship of human interferon alpha genes and pseudogenes.
J. Mol. Biol. 185, 227-260, 1985

Heron I; Hokland M & Berg K
13 native human interferon-alpha species assessed for immunoregulatory properties.
J. Interf. Res. 3 (2), 231-239, 1983

Higashi Y; Sokawa Y; Watanabe Y; Kawade Y; Ohno S; Takaoka C & Taniguchi T
Structure and expression of a cloned cDNA for mouse interferon-ß.
J. Biol. Chem. 258 (15), 9522-9529, 1983

Hiscott J; Cantell K & Weissmann C
Differential expression of human interferon genes.
Nuc. Acid Res. 12 (9), 3727-3746, 1984

Hiscott J; Ryals J; Dierks P; Hofmann V & Weissmann C
The expression of human interferon alpha genes.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) 307 (1132), 217-226, 1984

Ho M; Breinig MK; Postic B & Armstrong JA
The effect of preinjections on the stimulation of interferon by a complex polynucleotide endotoxin and virus.
Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 173, 680-688, 1970

Hovanessian AG & Kerr IM
The (2'-5')oligoadenylate (pppA2'-5'A2'-5'A)synthetase and protein kinase(s) from interferon-treated cells.
Eur. J. Biochem. 93, 515-526, 1979

Iwakura Y; Yonehara S & Kawade Y
Purification of mouse L cell interferon.
J. Biol. Chem. 253 (14), 5074-5079, 1978

Jameson P; Dixon MA & Grossberg SE
A sensitive interferon assay for many species of cells: EMC virus hemagglutination yield reduction.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155, 173-178, 1977

Johnson HM; Stanton GJ & Baron S
Relative ability of mitogens to stimulate production of interferon by lymphoid cells and to induce suppression of the in vitro immune response.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 138-143, 1977

Kawade Y; Aguet M & Tovey MG
Antigenic correlations between components of C243 and L cell interferon.
Antiviral Res. 2, 155-159, 1982

Kawade Y; Fujisawa J; Yonehara S; Iwakura Y & Yamamoto Y
Purification of L cell interferon.
Meth. Enzymol. 78, 522-532, 1981

Kawakita M; Carbrer B; Taira H; Rebello M; Slattery E; Weideli H & Lengyel P
Purification of interferon from mouse ehrlich ascites tumor cells.
J. Biol. Chem. 253 (2), 598-602, 1978

Kelley KA, Kozak CA; Dandoy F; Sor F; Skup D; Windass JD; DeMaeyer-Guignard J; Pitha PM & DeMeyer E
Mapping of murine interferon-alpha genes to chromosome 4.
Gene 26 (2-3), 181-188, 1983

Kelley KA; Kozak CA & Pitha PM
Localization of the mouse interferon-beta 1 gene to chromosome 4.
J. Interf. Res. 5 (3), 409-413, 1985a

Kelley KA & Pitha PM
Differential effect of poly rI.rC and Newcastle disease virus on the expression of interferon and cellular genes in mouse cells.
Virol. 147 (2), 382-393, 1985b

Kelley KA & Pitha PM
Characterization of a mouse interferon gene locus. I. Isolation of a cluster of four alpha interferon genes.
Nuc. Acid. Res. 13 (3), 805-823, 1985

King VP & Blakesley RW (1986)
Optimizing DNA ligations for transformation.
BRL Focus 8 (1), 1-3, 1986

Kirchner H; Hirt HM; Beck H & Munk K
Production of an antiviral factor by murine spleen cells after treatment with corynebacterium parvum.
Cell. Immunol. 31, 172-180, 1977

Knight E Jr.
Interferon: Purification and initial characterization from human diploid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (2), 520-523, 1976

Knight E JR. & Fahey D
Human interferon-beta: effects of deglycosylation.
J. Interf. Res. 2 (3), 421-429, 1982

Korput van der JA; Hilkens J; Kroezen V; Zwarthoff EC & Trapman J
Mouse interferon alpha and beta genes are linked at the centromere proximal region of chromosome 4.
J. Gen. Virol. 66 (3), 493-502, 1985

Koski JR; Poplack DG & Blaese RM
A nonspecific esterase stain for the identification of monocytes and macrophages.
In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity; BR Bloom & IR David, ed.; Academic Press, 359-362, 1976

Kramer MJ; Cleeland R & Grunberg E
Antiviral activity of 10-carboxymethyl-9-acridanone.
Antimicr. Agents Chemother. 78, 233-238, 1976

Kramer MJ; Taylor RL & Grossberg SE
Induction of interferon in mice by 10-carboxymethyl-9-acridanone.
Meth. Enzymol. 78, 284-287, 1981

Labdon JE; Gibson KD; Sun S & Pestka S
Some species of human leukocyte interferon are glycosylated.
Arch. Biochem. Biophys. 232 (1), 422-426, 1984

Laemmli UK
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 222, 680-685, 1970

Lawn RM; Gross M; Houck CM; Franke AE; Gray PV & Goeddel DV
DNA sequence of a major human leukocyte interferon gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (9), 5435-5439, 1981

Lawrence JB & Singer RH
Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression.
Nuc. Acid Res. 13 (5), 1777-1799, 1985

Le HV; Mays CA; Syto R; Nagabhushan TL& Trotta PP
Structure-function relations in purified recombinant murine gamma interferon.
The Biology of the Interferon System; Stewart WE & Schellekens H, eds., 73-76, 1985

Lebleu B; Sen GC; Shaila S; Carbrer B & Lengyel P
Interferon double stranded RNA and protein phosphorylation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (9), 3107-3111, 1976

Lengyel P
Mechanisms of interferon action; the (2'-5')(A)n synthetase-RNase L pathway.
Interferon 3, 77-99, 1981

Lovett M; Cox DR; Yee D; Boll W; Weissmann C; Epstein CJ & Epstein LB
The chromosomal location of mouse interferon alpha genes.
EMBO J. 3 (7), 1643-1646, 1984

Lucas DO & Epstein LB
Interferon and Macrophages.
The Reticuloendothelial System; Vol. 78 No. 6; SM Reichard & JM Filkins, eds., 143-168, 1985

MacMaster GK & Carmichael GG (1977)
Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.
Proc. Soc. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838, 1977

Machida H; Kawade Y & Watanabe Y
Antigenicity of mouse interferons induced in vitro and in vivo by Poly(I)-Poly(C).
J. Interf. Res. 4 (3), 347-353, 1984.

Maehara N & Ho M
Cellular origin of interferon induced by bacterial lipopolysaccharide.
Inf. Immun. 15 (1), 78-83, 1977

Maehara N; Ho M & Armstrong JA
Differences in mouse interferons according to cell source and mode of induction.
Inf. Immun. 17 (3), 572-579, 1977

Maniatis T; Fritsch EF & Sambrook J
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbour Laboratory, 1982

Marcucci F; Waller M; Kirchner H & Krammer P
Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures.
Nature 291, 79-81, 1981

Mauel J & Defendi V
Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40.
J. Exp. Med. 134, 335-349, 1971

Meerpohl H-G; Lohmann-Matthes M-L & Fischer H
Studies on the activation of mouse bone marrow-derived macrophages by the macrophage cytotoxicity factor (MCF).
Eur. J. Immunol. 6, 213-217, 1976

Melton DA; Krieg PA; Rebagliati MR; Maniatis T; Zinn K & Green MR
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.
Nuc. Acid Res. 12 (18), 7035-7056, 1984

Mijata T & Hayashida H
Recent divergence from a common ancestor of human IFN-α genes.
Nature 295, 165-168, 1982

Moore RN; Larsen HS; Horohov DW & Rouse BT
Endogenous regulation of macrophage proliferative expansion by colony-stimulating factor-induced interferon.
Science 233, 178-181, 1984a

Moore RN; Pitruzzello FJ; Larsen HS & Rouse BT
Feedback regulation of colony-stimulating factor (CSF-1)-induced macrophage proliferation by endogenous E prostaglandins and interferon α/β.
J. Immunol. 133 (2), 541-543, 1984b

Nagata S; Mantei M & Weissmann C
The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-α.
Nature 287, 401-408, 1980

Naylor SL; Gray PW & Lalley PA
Mouse immune interferon (IFN-gamma) gene is on chromosome 10.
Somatic Cell. Mol. Genet. 10 (5), 531-534, 1984

Naylor SL; Sakaguchi AY; Shows TB; Law ML; Goeddel DV & Gray PW
Human immune interferon gene is located on chromosome 12.
J. Exp. Med. 157 (3), 1020-1027, 1983

Norwood TH; Ziegler CJ & Martin GM
Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion.
Som. Cell Gen. 2 (3), 263-270, 1976

Ohno S & Taguchi T
The 5'-flanking sequence of human interferon-beta 1 gene is responsible for viral induction of transcription.
Nuc. Acid Res. 11 (16), 5403-5412, 1983

Ohno S & Taniguchi T
Structure of a chromosomal gene for human interferon ß.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (9), 5305-5309, 1981

Orchansky P; Novick D; Fischer DG & Rubinstein M
Type I and type II interferon receptors.
J. Interf. Res. 4 (2), 275-282, 1984

Osborne LC; Georgiades JA & Johnson HM
Large-scale production and partial purification of mouse immune interferon.
Inf. Immun. 23 (1), 80-86, 1979

Prebble OT; Rothko K; Klippel JH; Friedman RM & Johnston MI
Interferon-induced 2'-5' adenylate synthetase in vivo and interferon production in vitro by lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with and without circulating interferon.
J. Exp. Med. 157, 2140-2146, 1983

Ragg H & Weissmann C
Not more than 117 base pairs of 5'-flanking sequence are required for inducible expression of a human IFN-α gene.
Nature 303, 439-442, 1983

Raj NBK & Pitha PM
Interferon heterogeneity resulting from differences in glycosylation.
J. Interf. Res. 1 (4), 595-599, 1981

Raj NBK & Pitha PM
Two levels of regulation of ß-interferon gene expression in human cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3923-3927, 1983

Ratner L; Wiegand RC; Farrell PJ; Sen GC; Cabrer B & Lengyel P
Interferon, double-stranded RNA and RNA degradation.
Fractionation of the endonuclease int system into two macromolecular components; role of a small molecule in nucelase activation.
Bichem. Biophys. Res. Commun. 81 (3), 947-954, 1978

Rentrop M; Knapp B; Winter H & Schweizer J
Aninoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions.
Histochem. J. 18 (5), 271-276, 1986

Revel M; Ruggieri R & Zilberstein A
Expression of human IFN-β2 genes in rodent cells.
The Biology of the Interferon System 1985; Stewart WE & Schellekens H, eds., 207-216, 1985

Rigby PWJ; Dieckmann M; Rhodes C & Berg P
Labeling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113, 237-251, 1977

Schober I, Braun R; Reiser H; Munk K; Leroux M & Kirchner H
Ia-positive T lymphocytes are the producer cells of interferon gamma.
Exp. Cell Res. 152, 348-356, 1984

Seghal PB & Tamm T
The transcription unit for poly(I)-poly(C)-induced human fibroblast interferon messenger RNA.
Virology 102, 245-249, 1980

Seghal PB; Zilberstein A; Ruggieri M; May LT; Ferguson-Smith A; Slate DL; Revel M & Ruddle FH
Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (14), 5219-5222, 1986

Shaw GD; Boll W; Taira H; Mantei N; Lengyel P & Weissmann C
Structure and expression of cloned murine IFN-α genes.
Nuc. Acid Res. 11 (3), 555-573, 1983

Sklar MD; Shing-Erh Y; Chen BD-M & Walker WS
Immortalization of mouse bone marorw cells is associated with the endogenous production of macrophage colony stimulating factor.
Macrophage Biology, Alan R. Liss Inc., 673-693, 1985

Soberon X; Covarrubias L & Bolivar F
Construction and characterization of new cloning vehicle. IV Deletion derivatives of pBR322 and pBR325.
Gene 9, 287-305, 1980

Stewart II WE
The interferon system.
Springer-Verlag Wien New York, 1979

Stewart II WE
Distinct molecular species of interferons.
Virology 61, 80-86, 1974

Stewart II WE & Lockart RZ JR.
Relative antiviral resistance induced in homologous and heterologous cells by cross-reacting interferons.
J. Virol. 6, 795-799, 1970

Storch E & Kirchner H
Induction of interferon in murine bone marrow-derived macrophage cultures by 10-carboxymethyl-9-acridanone.
Eur. J. Immunol. 12, 793-796, 1982

Studier FW
Analysis of bacteriophage T7 of early RNAs and proteins on slab gels.
J. Mol. Biol. 79, 237-248, 1973

Sutcliffe JG
pBR322 restriction map derived from DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long.
Nuc. Acid Res. 5 (8), 2721-2728, 1978

Taira H; Broeze RJ; Jayaram BM; Lengyel P; Hunkapiller ME & Hood LE
Mouse interferons: amino terminal amino acid sequences of various species.
Science 207, 528-530, 1980

Taniguchi Y; Mantei N; Schwarzstein M; Nagata S; Muramatsu M & Wiessmann C
Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related.
Nature 285, 547-549, 1980

Tavernier J; Gheysen G; Duerinck F; Van der Hyden J & Fiers W
Deletion mapping of the inducible promoter of human IFN-ß gene.
Nature 301, 634-636, 1983

Taylor JL; Schoenheer C & Grossberg SE
Protection against Japanese encephalitis virus in mice and hamsters by treatment with carboxymethyl-acridanone, a potent interferon inducer.
J. Infect. Dis. 142 (3), 394-399, 1980

Thomas PS
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferrred to nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205, 1980

Trapman J
Distinct antigenic character of two components of poly(I)-poly(C) induced mouse L cell interferon.
FEBS Lett. 109 (1), 137-140, 1980

Trent JM; Olson S & Lawn RM
Chromosomal localization of human leukocyte fibroblast and immune interferon genes by means of in situ hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7809-7813, 1982

Vilcek J; Havell ER & Yamazaki S
Antigenic physicochemical and biological characterization of human interferons.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 284, 703-710, 1977

Vonk WP & Trapman J
Large scale one-step purification of murine interferon-beta using a monoclonal antibody.
J. Interf. Res. 3 (2), 169-175, 1983

Watanabe Y & Kawade Y
Properties of non-glycosylated human interferon-ß from MG63 cells.
J. Gen. Virol. 64, 1391-1395, 1983

Wetzel R
Assignment of the disulphide bonds of leukocyte interferon.
Nature 289, 606-607, 1981

Wietzerbin J; Stefanos S; Lucero M; Falcoff E; O'Malley J & Sulkowski E
Physico-chemical characterization and partial purification of mouse immune interferon.
J. Gen. Virol. 44, 773-781, 1979

Williams BRG; Kerr IM; Gilbert CS; White CN & Ball LA
Synthesis and breakdown of pppA2'p5'A2'p5'A and protein synthesis in extracts from interferon-treated and control cells.
Eur. J. Biochem. 92, 455-462, 1978

Wilston V; Jeffreys AJ; Barrie PA; Boseley PG; Slocombe PM; Easton A & Burke DC
A comparison of vertebrate interferon gene families detected by hybridization with human interferon DNA.
J. Mol. Biol. 166 (4), 457-475, 1983

Yamamoto Y
Antigenicity of mouse interferons: two distinct molecular species common to interferons of various sources.
Virology 111, 312-319, 1981

Yamamoto Y & Kawade Y
Antigenicity of mouse interferons: distinct antigenicity of the two L cell interferon species.
Virology 103, 80-88, 1980

Yanisch-Perron C; Vieira J & Messing J
Improved M13 phage cloning vector and host strains: nucleotide sequences of M13mP19 and PUC19 vectors.
Gene 33, 103-119, 1985

Yip YP; Barrowclough BS; Urban C & Vilcek J
Molecular weight of human gamma interferon is similar to that of other human interferons.
Science 215, 411-412, 1982

Zawatzky R; DeMaeyer E & DeMaeyer-Guignard J
Identification of individual interferon-producing cells by in situ hybridization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1136-1140, 1985

Zilberstein A; Ruggieri R; Korn JH & Revel M
Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2 a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines.
EMBO J. 5 (10), 2529-2537, 1986

Zilberstein A; Ruggieri R & Revel M
Human interferon-β2: is it an interferon-inducer?
Serono Symp. Vol. 24; The Interferon System; Dianzani F & Rossi GB, eds., 73-83, 1985

Zoon KC; Smith ME; Bridgen PJ; Anfinsen CB; Hunkapiller MW & Hood LE
Amino terminal sequence of the major component of human lymphoblastoid interferon.
Science 207, 527-528, 1980

Zwarthoff EC; Mooren ATA & Trapman J
Organization structure and expression of murine interferon alpha genes.
Nuc. Acid Res. 13 (3), 791-804, 1985

7. ABKÜRZUNGEN

BME	Basalmedium Eagle's
CIP	Calf Intestinal Phosphatase (alkalische Phosphatase)
CMA	10-Carboxymethyl-9-acridanon
CPE	zytopathischer Effekt (von Viren auf Zellen)
d	Dalton (Molekulargewichtseinheit)
D-MEM	modifiziertes Eagle's Medium nach Dulbecco
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraethylessigsäure
EMCV	Enzephalomyokarditisvirus
FBS	Fetal Bovine Serum (foetales Rinderserum)
HBSS	Hank's balanced salt solution (isotone Salzlösung)
IFN	Interferon
MEM	Eagle's Minimalmedium
MOI	Multiplicity of Infection (Anzahl der infektiösen Virionen pro Zelle bei in vitro Versuchen)
NDV	Newcastle Disease Virus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units (Plaque bildende Einheiten pro ml als Viruskonzentration)
PIC	Polyinosyl-polycytidylsäure
RNA	Ribonukleinsäure
S	Siemens (Einheit der Leitfähigkeit)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	TRIS/EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)

8. CURRICULUM VITAE

Gerhard Brehm

Geburtsdatum:	8. Dezember 1952
Geburtsort:	Stuttgart-Bad Cannstatt
Eltern:	Dr. med. Friedrich Brehm, Arzt Emma-Katharina Brehm
Staatsangehörigkeit:	deutsch
April 1958	Einschulung in die Stauferschule in Waiblingen
April 1962	Eintritt in das Staufer-Gymnasium Waiblingen
Juli 1972	Abitur am Institut Rosenberg, St. Gallen, Schweiz
Januar 1973	Beginn des Wehrdienstes
Oktober 1974	Beginn des Chemiestudiums an der Universität Stuttgart
April 1977	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
März 1980	Diplom-Vorprüfung
November 1982	mündliche Diplomprüfung
März 1984	Diplom der Biochemie
März 1984 - Mai 1987	Dissertation im Institut für Virusforschung am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg bei Prof. Dr. H. Kirchner